Spaltung von Inter-α-Trypsin-Inhibitor durch Rinder-Trypsin, Schweine- und Human-Plasmin sowie Schweine-Pankreas-Kallikrein und Hemmverhalten des nativen Inhibitors und seiner Spaltprodukte gegenüber den spaltenden Enzymen

Wolfgang Dobrinski

1981

Aus der Abteilung für
Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik
der Ludwig Maximilians-Universität
München

Leitung: Prof. Dr. Hans Fritz

Spaltung von Inter-α-Trypsin-Inhibitor durch Rinder-Trypsin, Schweine- und Human-Plasmin sowie Schweine-Pankreas-Kallikrein und Hemmverhalten des nativen Inhibitors und seiner Spaltprodukte gegenüber den spaltenden Enzymen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der
Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Wolfgang Dobrinski
aus
Garmisch-Partenkirchen

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Fritz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. M. Knedel
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	2.7.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Fritz an der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik der Universität München.

Herrn Prof. Dr. H. Fritz bin ich für die großzügige Unterstützung dankbar.

Besonders danke ich Herrn Dr. Th. Dietl für seine Anleitung und zahlreiche Ratschläge, durch die es gelang, die Probleme und Schwierigkeiten dieser Arbeit zu lösen.

Danken möchte ich auch Frau B. Förg-Brey für die Durchführung der Trypsin-Titration mit NPGB.

Herrn Prof. Dr. K. Hochstrasser danke ich für die Bereitstellung des Inter-α-Trypsin-Inhibitors.

ABKÜRZUNGEN

ITI = Inter-α-Trypsin-Inhibitor

BAPA = N-α-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid
NPGB = p-Nitrophenyl-p-guanidinobenzoat
pNA = p-Nitroanilin

TRA = Triäthanolamin
Tris = Trishydroxymethyl-aminomethan

Arg = Arginin
Leu = Leucin
Lys = Lysin
Phe = Phenylalanin
Pro = Prolin
Val = Valin

MG = Molekulargewicht
U = Unit(s) = Enzym-Aktivitäts-Einheit(en)
= µMol umgesetztes Substrat pro Minute bei 25°C
IU = Inhibitor Unit(s)
(1 IU entspricht der Hemmung von 1 U)

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Abkürzungen

A. Einleitung 1

1. Protein-Proteinase-Inhibitoren 1
2. Inhibitoren im menschlichen Organismus 2
3. Der Inter-α-Trypsin-Inhibitor 3
4. Niedermolekulare säurestabile Inhibitoren in Plasma und Urin 4
5. Aufgabenstellung 6

B. Ergebnisse eigener Messungen 8

Allgemeine Versuchsplanung 8

I. Messungen mit Rinder-Trypsin 10

1. Bestimmung der Trypsin-Aktivität mit dem BAPA-Test 10
2. Ermittlung der Molarität des Trypsins mit dem NPGB-Test 10
3. Messung der Molarität von Aprotinin 13
4. Hemmung von Trypsin durch nativen ITI 15
5. Die Säurefällung als wichtige Hilfsmethode bei der Messung der Spaltgeschwindigkeit von ITI 16
6. Denaturierung von Trypsin in Perchlorsäure 18
7. Spaltung von ITI durch Trypsin 19
8. Einstellung des Hemmgleichgewichts zwischen Trypsin und säurestabilem Inhibitor 22
9. Anteil des vor der tryptischen Spaltung im ITI-Präparat vorhandenen säurestabilen Inhibitors 24

II. Messungen mit Schweine-Plasmin 25

1. Bestimmung der Aktivität von Schweine-Plasmin im BAPA-Test 25
2. Molarität des Schweine-Plasmins 25

Seite

3. Hemmgleichgewicht zwischen Schweine-Plasmin und Aprotinin 26

4. Hemmung von Schweine-Plasmin durch nativen Inter-α-Trypsin-Inhibitor 27

5. Hemmgleichgewicht zwischen Schweine-Plasmin und Inter-α-Trypsin-Inhibitor 27

6. Denaturierung des Schweine-Plasmins durch Perchlorsäure 28

7. Spaltung von ITI durch Schweine-Plasmin 28

8. Hemmung von Schweine-Plasmin durch trypsinolytisch freigesetzten Inhibitor 31

9. Hemmung von Schweine-Plasmin durch plasminolytisch gewonnenen Inhibitor 32

10. Überprüfung der Hemmaktivität von nativem ITI 34

III. Messungen mit Human-Plasmin 36

1. Aktivierung von Human-Plasminogen mit Streptokinase 36

2. Aktivität des Human-Plasmins 36

3. Molarität des Human-Plasmins 37

4. Hemmung von Human-Plasmin durch nativen ITI 38

5. Spaltung von ITI durch Human-Plasmin 39

6. Hemmung von Human-Plasmin durch trypsinolytisch entstandenen säurestabilen Inhibitor 41

7. Hemmung von Human-Plasmin durch plasminolytisch entstandenen säurestabilen Inhibitor 43

IV. Messungen mit Schweine-Pankreas-Kallikrein 44

1. Bestimmung der Kallikrein-Aktivität 44

2. Molarität des Schweine-Pankreas-Kallikreins 44

3. Hemmgleichgewicht zwischen Schweine-Pankreas-Kallikrein und Aprotinin 45

4. Spaltung von ITI durch Schweine-Pankreas-Kallikrein 46

5. Empfindlichkeit von Schweine-Pankreas-Kallikrein gegenüber Perchlorsäure 49

6. Einfluß von Schweine-Pankreas-Kallikrein auf die BAPA-Spaltung 50

7. Empfindlichkeit trypsinolytisch entstandenen Inhibitors gegenüber warmer Perchlorsäure 51

Seite

8. Denaturierung von Schweine-Pankreas-Kallikrein in 45°C warmer Perchlorsäure 52

9. Spaltung von ITI durch hohen Überschuß von Schweine-Pankreas-Kallikrein 52

10. Hemmung von Kallikrein durch trypsinolytisch entstandenen Inhibitor 55

11. Hemmung von Kallikrein durch kallikreingespaltenen säurestabilen Inhibitor 55

12. Beeinflussung der Kallikrein-Aktivität durch nativen ITI 56

V. Die proteolytische Verunreinigung in der ITI-Stammlösung 57

1. Nachweis einer proteolytischen Verunreinigung in der ITI-Stammlösung 57

2. Spaltung verschiedener Substrate mit ITI-Stammlösung 57

3. Empfindlichkeit der proteolytischen Verunreinigung gegenüber Perchlorsäure 58

4. Hemmbarkeit der enzymatischen Aktivität durch verschiedene Inhibitoren 58

5. Hemmbarkeit der enzymatischen Aktivität durch NPGB 59

C. Diskussion 61

D. Experimentelle Details 66

Geräte und Substanzen 66

I. Messungen mit Rinder-Trypsin 68

1. Der BAPA-Test 68

2. Der NPGB-Test 68

3. Hemmung von Trypsin durch Aprotinin 69

4. Hemmung von Trypsin durch nativen ITI 69

5. Spaltung von ITI durch Trypsin 69

6. Denaturierung von Trypsin in Perchlorsäure 70

7. Hemmgleichgewicht zwischen Trypsin und säurestabilem Inhibitor 70

Seite

II. Messungen mit Schweine-Plasmin 71

1. Der BAPA-Test 71
2. Spaltung von ITI durch Schweine-Plasmin 71
3. Hemmung durch plasminolytisch gewonnenen säurestabilen Inhibitor 71

III. Messungen mit Human-Plasmin 72

1. Aktivierung mit Streptokinase 72
2. Messung der Aktivität von Human-Plasmin 72
3. Spaltung von ITI durch Human-Plasmin 73
4. Plasmin-Hemmung durch plasminolytisch gewonnenen säurestabilen Inhibitor 73

IV. Messungen mit Schweine-Pankreas-Kallikrein 73

1. Aktivitätsmessung 73
2. Spaltung von ITI durch Kallikrein 74
3. Spaltung von ITI durch Kallikrein im Molverhältnis 1 : 26 74

V. Untersuchungen über die proteolytische Verunreinigung im ITI-Präparat 75

1. Aktivitätsmessung 75
2. Hemmung durch NPGB 75

E. Zusammenfassung 76

F. Literaturverzeichnis 78

A. EINLEITUNG

1. Protein-Proteinase-Inhibitoren

Protein-Proteinase-Inhibitoren wurden von Laskowski und Sealock (32) als Proteine definiert, die mit einer oder mehreren Proteinasen reversible stöchiometrische Komplexe bilden, in denen alle katalytischen Funktionen kompetitiv gehemmt sind. Solche Hemmstoffe sind in der Natur weit verbreitet (46).

An Inhibitoren aus Sojabohnen und Ovomucoid konnte erstmals gezeigt werden (11,35), daß Proteinase-Inhibitoren - in Analogie zum aktiven Zentrum der Enzyme - ein reaktives Zentrum besitzen, das in seiner Aminosäuresequenz der Spaltstelle des natürlichen Substrats entspricht. In der Nähe des reaktiven Zentrums befindet sich häufig eine Disulfidbrücke (30), welche das Molekül stabilisiert, so daß der Inhibitor vom Enzym nicht wie das Substrat gespalten und in Bruchstücken freigesetzt wird, sondern komplexiert an das katalytische Zentrum des Enzyms gebunden bleibt und so den Zutritt von Substratmolekülen verhindert.

Die meisten Protein-Proteinase-Inhibitoren aus Pflanzen und aus tierischen oder menschlichen Drüsen und Sekreten haben Molekulargewichte zwischen 5 000 und 60 000. Viele von ihnen sind schon isoliert, in ihrer Aminosäuresequenz und räumlichen Struktur erforscht und hinsichtlich ihres Hemmverhaltens gegenüber verschiedenen Proteinasen charakterisiert worden. Umgekehrt lassen sich mit Hilfe hochspezifischer Inhibitoren, die nur eine oder wenige Proteinasen hemmen, auf elegante Weise Enzyme identifizieren oder zumindest charakterisieren.

Der breitspezifische Proteinasen-Inhibitor Aprotinin (Trasylol^{R}) findet therapeutische Anwendung bei traumatischem Schock, Fettembolie, akuter Pankreatitis, pankreatogenem Schock, Perforationsperitonitis, septischem Schock, hämorrhagischem Schock und hyperfibrinolytischer Blutung. Aprotinin hemmt Kallikrein, Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und eine Reihe von Gewebs- und leukozytären Proteinasen. Ferner hemmt es die Aktivierung von Plasmafaktoren in der Vorphase der Gerinnung[1].

2. Inhibitoren im menschlichen Organismus

In menschlichen Drüsen und Sekreten, insbesondere im Schleim von Respirations-, Digestions- und Genitaltrakt wurden Proteinase-Inhibitoren gefunden (23,24, 38,39,47), die elastolytische Leukozyten-Proteinasen hemmen (22). Wenn Proteinase-Inhibitoren fehlen oder vermindert sind, wie dies beim kongenitalen α_1-Antitrypsin-Mangel (Eriksson-Laurell-Syndrom) der Fall ist, resultiert mangelhafter Schutz gegenüber bakteriellen und leukozytären Proteinasen. Es kommt zu chronischer Entzündung und Autodigestion, speziell bei dem genannten Krankheitsbild zu chronischer Bronchitis und Emphysem (28,40).

Auch im menschlichen Blut-Plasma kommen Proteinase-Inhibitoren vor. In der folgenden Aufstellung (21) sind die wichtigsten von ihnen aufgeführt, sowie die Umstände, unter denen die einzelnen Inhibitoren im Plasma vermehrt oder vermindert sind[2]:

---

1) Prospekt der Firma Bayer, Leverkusen über Trasylol^{R}

2) Tabelle der Proteine des menschlichen Blutplasmas, Behringwerke, Frankfurt/Main

α_1-Antitrypsin
MG 54 000, normale Konzentration: 200-400 mg/100 ml
vermehrt bei entzündlichen Prozessen und Tumoren;
bei Hypo-α_1-Antitrypsinämie Lungenemphysem.

α_1-Antichymotrypsin
MG 68 000, normal 30-60 mg/100 ml Plasma.
Akutphasenprotein.

Inter-α-Trypsin-Inhibitor
MG ca. 160 000, normal 20-70 mg/100 ml Plasma.

Antithrombin III
MG 65 000, normal 22-39 mg/100 ml Plasma
vermindert bei Leberschäden, unter oralen Antikonzeptiva sowie bei Verbrauchskoagulopathie.

C1-Inaktivator
MG 104 000, normal 15-35 mg/100 ml Plasma
Inhibitor für die Komplementfaktoren C1r und C1s,
Plasmin, Plasma-Kallikrein und Hagemannfaktor;
vermindert bei angioneurotischem Oedem.

α_2-Makroglobulin
MG 820 000, normal 150-350 mg/100 ml (♂) bzw. 175-350 mg % (♀)
Inhibiert sehr viele Proteinasen;
stark vermehrt bei nephrotischem Syndrom, etwas
vermehrt bei Leberleiden und bei Diabetes mellitus.

3. Der Inter-α-Trypsin-Inhibitor

Der Inter-α-Trypsin-Inhibitor (21,42) ist ein Glykoprotein mit einem Peptidgehalt von 91 %. Er enthält 3,4 % Hexose, 3,5 % Hexosamin und 2 % Sialinsäure (43). Seine Aminosäurezusammensetzung wurde von Heimburger et al. bestimmt (20). Bei der Papier- und Zelluloseacetat-Elektrophorese (Barbital-Puffer, pH 8,2-8,6) wandert er zwischen den α_1- und den α_2-Globulinen (19).

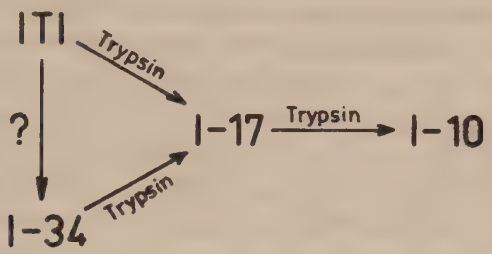
Der Inter-α-Trypsin-Inhibitor gehört zu der Klasse von Trypsin-Inhibitoren, die Arginin im reaktiven Zentrum haben (13). Gehemmt werden hauptsächlich Trypsin (4,7,10,33,45), schwächer Chymotrypsin (4), Akrosin (14) und Schweine-Elastase (4). Bei Human-Plasmin wurde schwache Hemmung beobachtet (43).

Der Inhibitor läßt sich nach zwei Verfahren isolieren:
- nach der Methode von Heimburger (20) durch Ionenaustausch-Chromatographie und anschließende Gel-Filtration aus frischem Plasma;
- nach der Methode von Steinbuch (43) aus Fraktion III der modifizierten Nitschmann-Auftrennung (34) oder aus ACD-Plasma.

4. Niedermolekulare säurestabile Inhibitoren in Plasma und Urin

In menschlichem Plasma und Urin kommen niedermolekulare säurestabile Proteinase-Inhibitoren vor (1,2,3,41), deren Konzentrationen bei Nephropathien verschiedener Ätiologie (8,9,26,27) erhöht sind und die immunologisch mit dem Inter-α-Trypsin-Inhibitor verwandt sind (25,26,37). Diese Hemmstoffe in Plasma und Urin werden nicht in sekretorischen Drüsen und Schleimhäuten synthetisiert. Sie werden durch einen bisher unbekannten, aber wahrscheinlich limitierten proteolytischen Vorgang aus ihrer hochmolekularen Vorstufe, dem Inter-α-Trypsin-Inhibitor, abgespalten und anschließend über die Niere in den Harn ausgeschieden (29). Hochstrasser stellte durch Behandlung mit Trypsin sowohl aus nativem Serum-ITI als auch aus dem physiologischen säurestabilen Inhibitor mit dem Molekulargewicht 34 000 Inhibitoren mit den Molekulargewichten 17 000 und 10 000 her (29).

Die Inhibitoren sollen auf folgendem (vereinfacht dargestelltem) Reaktionsweg aus ITI entstehen (29):



ITI = Inter-α-Trypsin-Inhibitor (MG 160 000)
I-34 = säurestab. Inhibitor mit MG 34 000
I-17 = säurestab. Inhibitor mit MG 17 000
I-10 = säurestab. Inhibitor mit MG 10 000

Später gelang es, nach Inkubation von ITI mit Schweine-Pankreas-Kallikrein ein säurestabiles Bruchstück nachzuweisen, das hinsichtlich der immunelektrophoretischen Eigenschaften und des Hemmverhaltens mit dem physiologischen säurestabilen Proteinase-Inhibitor aus Serum und Urin (MG 34 000) identisch ist (5). Weiterhin zeigte Steinbuch (43), daß nach Zugabe einer kleinen Menge Plasmin zu einer homogenen ITI-Präparation Spaltprodukte mit höherer und niedrigerer elektrophoretischer Beweglichkeit entstehen, die stärkere Hemmstoffe als ITI sind.

Bei Nierenschäden verschiedener Genese und bei Sepsis ist die Konzentration von ITI im Plasma vermindert, während die von I-34 vermehrt ist. Bei Leberschäden sind die Konzentrationen von ITI und I-34 im Serum vermindert. Nach Nierentransplantation weist eine steigende Konzentration von I-34 im Harn früher (27) auf eine Abstoßungskrise hin als die Kreatinin-Konzentration.

ITI selbst ist weder säure- noch hitzestabil. Die Spaltprodukte sind säurestabil, aber nicht hitzestabil. Mit der Bezeichnung "niedermolekular" sind hier einfach die proteolytisch aus ITI freigesetzten Inhibitoren gemeint (z. B. durch tryptische Spaltung). Sie dürfen nicht mit den in anderer Literatur "niedermolekular" genannten Inhibitoren verwechselt werden, die Molekulargewichte zwischen 5 000 und 12 000 haben und nicht nur säure-, sondern auch hitzestabil sind (31,46).

Die aus ITI freigesetzten niedermolekularen Inhibitoren unterscheiden sich von ITI in folgenden Eigenschaften:
_erleichterte Diffusion,
_glomeruläre Filtration, damit Nierengängigkeit,
_keine Denaturierung im sauren Harn,
ferner möglicherweise durch
_stärkere Affinität zu Enzymen (kleineres K_i) und
_breiteres Hemmspektrum.
Diese Eigenschaften können die Voraussetzung für eine besondere physiologische Funktion dieser Inhibitoren sein.

5. Aufgabenstellung

Wenn man annimmt, daß die säurestabilen Inhibitoren wirklich durch proteolytische Spaltung aus ITI im Blut freigesetzt werden, dann erhebt sich die Frage, welche Proteinase diese Spaltung in vivo katalysiert. Da mit Trypsin (29), Kallikrein (5) und Plasmin (43) bereits Spaltung von ITI nachgewiesen worden ist, sollen mit diesen Enzymen im in vitro-Test unter Standard-Bedingungen die Geschwindigkeiten der Spaltung von ITI bestimmt werden. Als einziges menschliches Enzym steht

dabei lediglich Human-Plasmin in hochgereinigter Form für die Experimente zur Verfügung. Als weitere Proteinasen werden Schweine-Plasmin, Rinder-Trypsin und Schweine-Pankreas-Kallikrein verwendet.

Außerdem soll das Hemmverhalten von ITI und seinen enzymatischen Spaltprodukten gegenüber den spaltenden Enzymen verglichen werden. Aus im Vergleich zum ITI neuen Hemmeigenschaften der Spaltprodukte lassen sich möglicherweise Hinweise auf die besondere physiologische Funktion der niedermolekularen säurestabilen Inhibitoren gewinnen.

B. ERGEBNISSE EIGENER MESSUNGEN

Allgemeine Versuchsplanung

1. Zum Vergleich der enzymatischen Spaltgeschwindigkeiten mit verschiedenen Proteinasen sind Inkubationen von gleichbleibenden Molverhältnissen zwischen Enzym und ITI notwendig. Aus diesem Grund werden vorweg die molaren Konzentrationen der verwendeten Enzym- und Inhibitorlösungen bestimmt.

   a) Die Enzymmolarität pro Aktivitätseinheit [Mol/U] wird für Trypsin mit dem NPGB-Test gemessen.
   Die Molarität der anderen Enzyme (Schweine- und Human-Plasmin, Schweine-Pankreas-Kallikrein) wird durch Hemmung mit Aprotinin bestimmt, dessen Molarität wiederum durch Hemmung von Trypsin ermittelt wird.

   b) Die Molarität eines Enzyms pro Gramm Einwaage ist gleich dem Produkt aus der Molarität pro Aktivitätseinheit und der Aktivität des Enzyms pro Gramm Einwaage.
   Die Enzymaktivitäten werden bei Trypsin und Schweine-Plasmin im BAPA-Test gemessen, bei den anderen Enzymen mit den KABI-Substraten S-2251 (für Human-Plasmin) und S-2266 (für Schweine-Pankreas-Kallikrein).

   c) Die Molarität der ITI-Lösung wird durch Hemmung von Trypsin bekannter Molarität im BAPA-Test bestimmt.

2. Durch ITI-Spaltung mit Trypsin wird der Enzymüberschuß ermittelt, bei dem die Spaltungsreaktion schnell genug abläuft und doch zeitlich noch bequem zu verfolgen ist. Das so ermittelte molare Enzym-Inhibitor-Verhältnis wird dann bei allen Inkubationen mit den verschiedenen Enzymen beibehalten. Auf diese Weise werden gleiche Bedingungen geschaffen für die Messungen der Spaltgeschwindigkeiten mit verschiedenen Enzymen.

3. Die Geschwindigkeit der Spaltung von ITI in niedermolekulare Inhibitoren läßt sich nicht direkt durch Farbänderung im optischen Test messen. Statt dessen wird zu verschiedenen Zeiten nach Spaltungsbeginn in einer Probe des Inkubationsgemischs der bis dahin noch nicht gespaltene säureempfindliche ITI durch Säurefällung und Zentrifugation von den freigesetzten säurestabilen Bruchstücken abgetrennt. Die kleinen Mengen stark sauren Überstands müssen mit eingestellter K_2CO_3-Lösung zuverlässig neutralisiert werden. Anschließend werden die enthaltenen säurestabilen Inhibitoren durch Hemmung von Trypsin im BAPA-Test quantitativ bestimmt. Auf diese Weise läßt sich über den punktuellen Nachweis der Spaltprodukte zu verschiedenen Zeiten nach Reaktionsbeginn die Spaltgeschwindigkeit der Enzyme gegenüber ITI ermitteln.

4. Schließlich wird die Hemmung des spaltenden Enzyms
_durch die von ihm aus ITI freigesetzten Inhibitoren,
_durch die tryptischen Spaltprodukte und
_durch nativen ITI
mit den jeweils für die Aktivitätsbestimmung verwendeten Substraten gemessen.

I. Messungen mit Rinder-Trypsin

1. Bestimmung der Trypsin-Aktivität mit dem BAPA-Test (44)

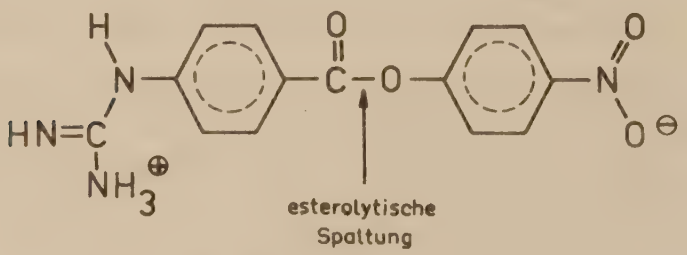
Trypsin spaltet aus dem synthetischen Substrat
Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid (BAPA)
den gelben Farbstoff p-Nitroanilin (pNA) ab, der bei $\lambda = 405$ nm den molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{405} = 9{,}950 \cdot 10^3$ l·Mol^{-1}·cm^{-1} besitzt. Die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme bei Reaktionsbeginn ist der Aktivität des eingesetzten Trypsins direkt proportional.

Zur Stabilisierung des Trypsins werden dem Puffer Calcium-Ionen zugesetzt. Bei Messungen ohne Calcium-Zusatz ist die Trypsin-Aktivität um 23 % niedriger und mit großem zufälligem Meßfehler behaftet.

Bei 25°C ergibt sich die spezifische Aktivität des Trypsins zu 1,5 U/mg Trypsin(-Einwaage).

2. Ermittlung der Molarität des Trypsins mit dem NPGB-Test (6)

p-Nitrophenyl-p-guanidinobenzoat (NPGB) hat folgende chemische Struktur:



Trypsin und andere Serin-Proteinasen lagern das NPGB-Molekül in die Enzymtasche ein. Durch die aktivierte Hydroxylgruppe des Serins im katalytischen Zentrum erfolgt sodann Spaltung der Esterbindung im NPGB-Molekül. Der gelbe Farbstoff p-Nitrophenol wird frei, der bei $\lambda = 405$ nm und pH 8 den molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{405} = 16{,}240 \cdot 10^3\ l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ besitzt. Die Serin-Hydroxylgruppe bleibt jedoch mit Guanidinobenzoat verestert, wodurch das aktive Zentrum der Proteinase für weitere Substratmoleküle blockiert ist. Im Idealfall spaltet also jedes Trypsinmolekül aus genau einem NPGB-Molekül genau ein Farbstoffmolekül ab und wird dabei inaktiviert. Wenn das gesamte eingesetzte Trypsin verbraucht ist, kommt die Reaktion fast zum Stillstand. Aus der Extinktionsdifferenz vor und nach der Spaltungsreaktion läßt sich dann die eingesetzte Trypsin-Konzentration bestimmen.

$$\Delta E = \varepsilon \cdot d \cdot \Delta c_{Farb}$$

$$\Delta c_{Farb} = \frac{\Delta E}{\varepsilon \cdot d} = c_{Trypsin}$$

ΔE = Extinktionsdifferenz
ε = Extinktionskoeffizient
d = Schichtdicke der Küvette
c bzw. Δc = Konzentration bzw. Konz.-Differenz

Wenn man das NPGB zum Reaktionsgemisch aus Enzym und Puffer gibt, ist jedoch bereits ein Teil des NPGB gespalten, d.h. gefärbt. Um diesen Anteil zu erfassen, führt man zusätzlich eine Leerwertmessung durch, d.h. man gibt NPGB zu einer Pufferlösung ohne Enzym und mißt die Extinktionszunahme ΔE_o. Dieser Leerwert muß von ΔE abgezogen werden.

Während der enzymatischen Spaltungsreaktion zerfällt ein Teil des NPGB durch Eigenspaltung. Die Geschwindigkeit der Eigenspaltung ist während und nach Ablauf der enzymatischen Spaltung praktisch gleich. Die Eigenspaltung läßt sich eliminieren, indem man den Extinktionsanstieg nach Beendigung der esterolytischen Spaltung linear auf den Zeitpunkt des Reaktionsbeginns extrapoliert.

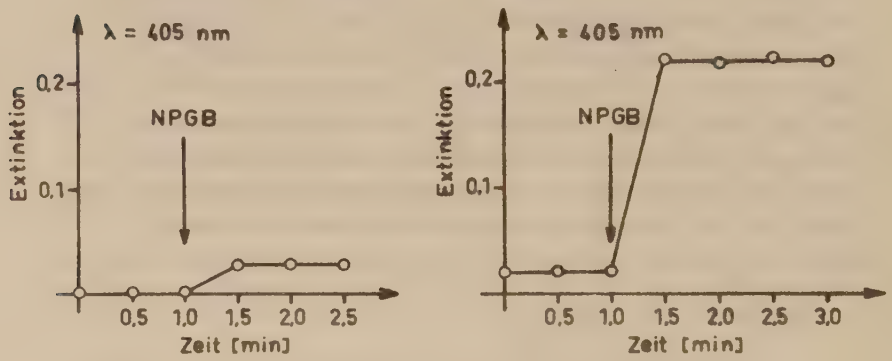


Abb. 1: Extinktionszunahme infolge esterolytischer Spaltung von NPGB durch 400 µg Trypsin (rechts); links: Leerwertbestimmung (ohne Trypsin)

Meßergebnis der NPGB-Titration:

Verwendete Reagentien und Pipettierschema: Siehe expt. Teil (Kap. D.I.2).

Gemessene Extinktionswerte:

$\Delta E = 0{,}175$
$\Delta E = 0{,}170$ } mit 50 µl Trypsinlösung

$\Delta E = 0{,}340$ mit 100 µl Trypsinlösung

Der Leerwert ΔE_0 und die Eigenspaltung sind bereits abgezogen.

Trypsin-Konzentration in der Küvette:

$$c_{Try} = \frac{\Delta E}{\varepsilon \cdot d} = \frac{0{,}340}{16{,}24 \cdot 10^3} \frac{Mol}{l} = 20{,}9 \frac{\mu Mol}{l}$$

mit $\varepsilon = 16{,}240 \cdot 10^3\ l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ und $d = 1$ cm

Die Trypsin-Konzentration in der Küvette muß noch mit dem Verdünnungsfaktor

$$\frac{\text{Volumen in der Küvette}}{\text{Volumen eingesetzte Trypsinlösung}}$$

(in diesem Fall: 1010 µl/ 100 µl) multipliziert werden, damit man die molare Konzentration der eingesetzten Trypsinlösung erhält:

$$c_{eingesetzt} = \frac{1010}{100} \cdot 20{,}9 \frac{\mu Mol}{l} = 0{,}21 \frac{mMol}{l}$$

Ein Teil der für den NPGB-Test angesetzten Trypsinlösung wird nun mit destilliertem Wasser auf das 50-fache Volumen verdünnt. Die Aktivität dieser Trypsinverdünnung ($4{,}2 \frac{\mu Mol}{l}$) wird im BAPA-Test gemessen: $2{,}1 \cdot 10^{-10}$ Mol haben eine Aktivität von 12,7 mU.

1 U Trypsin-Aktivität entspricht somit $\frac{2{,}1 \cdot 10^{-10}\ Mol}{12{,}7}$

$$= 1{,}65 \cdot 10^{-8}\ Mol.$$

3. Messung der Molarität von Aprotinin

Die molare Konzentration der anderen Enzyme läßt sich weniger gut im NPGB-Test bestimmen. Die Esterbindung zwischen Guanidinobenzoat und der Hydroxylgruppe des Enzym-Serins wird nämlich bei anderen Enzymen z. T. relativ schnell hydrolysiert. Deshalb läßt sich kein scharfer Extinktionssprung messen. Außerdem ist der NPGB-Test für teure und seltene Enzyme nicht praktikabel. Um deutlich meßbare Extinktionsänderungen zu erreichen, benötigt man nämlich hohe Enzym-Konzentrationen, da bei diesem Test ein Enzymmolekül ja nur ein Farbstoffmolekül aus NPGB freisetzt.

Deshalb wird die Molarität von Plasmin und Kallikrein durch Hemmung mit Aprotinin gemessen, dessen molare Konzentration hier durch Hemmung von Trypsin ermittelt wird.

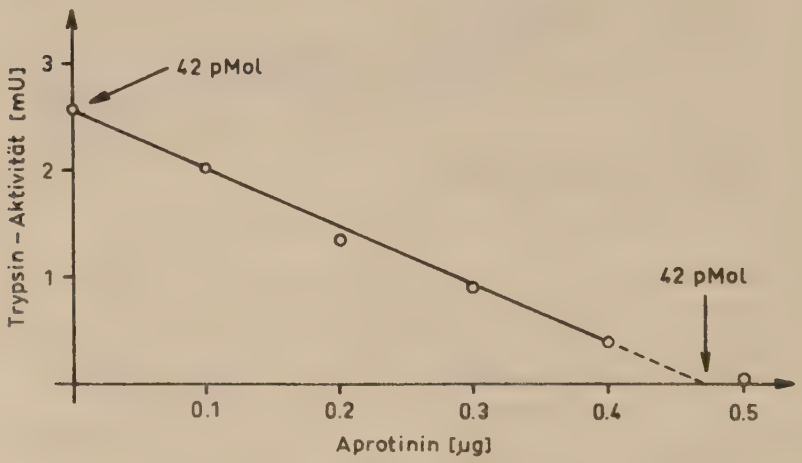


Abb. 2: Hemmung von 42 pMol Trypsin durch Aprotinin

0,472 µg Aprotinin hemmen 2,56 mU Trypsin.

Hemmaktivität des Aprotinins = $\frac{2,56}{0,472}\ \frac{\text{mIU}}{\mu\text{g}} = 5,42\ \frac{\text{IU}}{\text{mg}}$

Molarität des Aprotinins = $5,42 \cdot 1,65 \cdot 10^{-8}\ \frac{\text{Mol}}{\text{mg}}$

$= 9,0 \cdot 10^{-5}\ \frac{\text{Mol}}{\text{g Einwaage}}$

Der Umrechnungsfaktor $1,65 \cdot 10^{-8}\ \frac{\text{Mol}}{\text{IU}}$ stammt aus B.I.2.

4. Hemmung von Trypsin durch nativen Inter-α-Trypsin-Inhibitor

Verwendete Substanzen und Pipettierschema: Siehe expt. Teil (Kap. D.I.4).

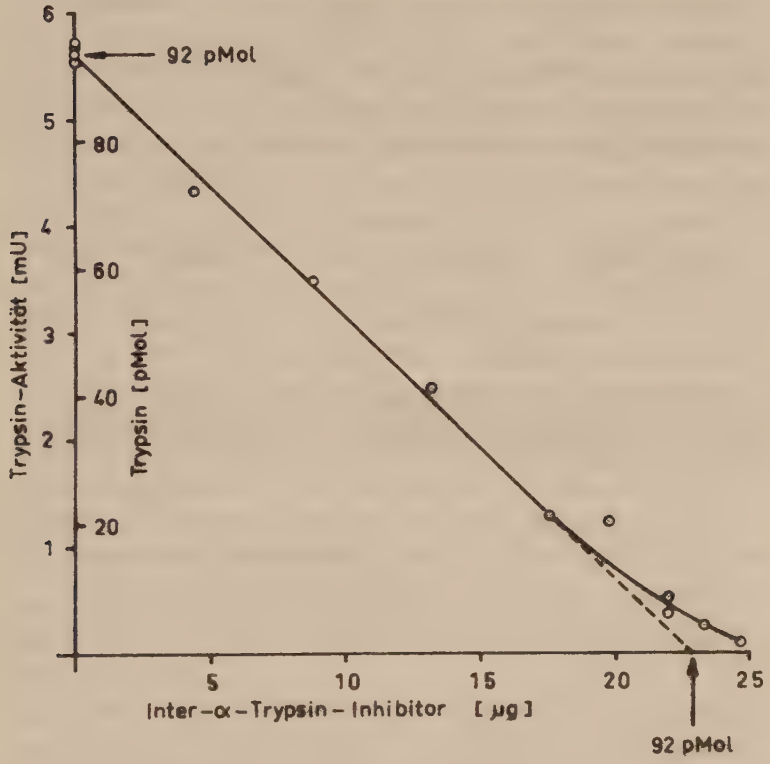


Abb. 3: Hemmung von 92 pMol Trypsin durch nativen Inter-α-Trypsin-Inhibitor

Aus der Hemmkurve ergibt sich die Hemmaktivität des ITI zu $\frac{5,6\ \text{mIU}}{22,9\ \mu\text{g}} = 245\ \frac{\text{mIU}}{\text{mg ITI}}$.

Die Hemmaktivität der ITI-Stammlösung (22 mg/ml) ist dann $245 \frac{\text{mIU}}{\text{mg ITI}} \cdot 22 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 5{,}38 \cdot 10^3 \frac{\text{mIU}}{\text{ml}}$.

Die Molarität der ITI-Stammlösung ergibt sich zu

$\frac{\text{Trypsin-Molarität}}{\text{Aktivitätseinheit}} \cdot$ Hemmaktivität des ITI =

$= 1{,}65 \cdot 10^{-11} \frac{\text{Mol}}{\text{mU}} \cdot 5{,}38 \cdot 10^3 \frac{\text{mIU}}{\text{ml}} = 8{,}9 \cdot 10^{-5} \frac{\text{Mol}}{\text{l}}$.

Der Umrechnungsfaktor $1{,}65 \cdot 10^{-11} \frac{\text{Mol}}{\text{mU}}$ ist aus dem NPGB-Test (Kap. B.I.2) übernommen.

Die Dissoziationskonstante K_i des Enzym-Inhibitor-Komplexes errechnet sich nach Green und Work (18) zu:

$$K_i = \frac{E_{frei}^2}{E_{ges} - E_{frei}} = \frac{0{,}3^2}{5{,}6 - 0{,}3} \cdot 1{,}65 \cdot 10^{-8} \frac{\text{mMol}}{\text{ml}} =$$

$$= 3 \cdot 10^{-10} \frac{\text{Mol}}{\text{l}}.$$

5. Die Säurefällung als wichtige Hilfsmethode bei der Messung der Spaltgeschwindigkeit von Inter-α-Trypsin-Inhibitor

Die Säurestabilität der ITI-Spaltprodukte im Gegensatz zur Säureempfindlichkeit des als Ausgangsstoff eingesetzten nativen Inter-α-Trypsin-Inhibitors erlaubt die quantitative Abtrennung der niedermolekularen Inhibitoren.

Ein Gemisch aus Enzym und nativem ITI wird in definiertem molarem Verhältnis bei konstanter Temperatur in Pufferlösung inkubiert. Dabei spaltet das Enzym den säurelabilen ITI in säurestabilen Inhibitor und einen säureempfindlichen, inaktiven Rest.

Zu festgelegten Zeitpunkten nach Reaktionsbeginn wird die Spaltung in einer Probe des Inkubationsgemischs durch Ansäuerung mit 6 %-iger Perchlorsäure beendet.

Obwohl das spaltende Enzym, der bis dahin noch nicht gespaltene ITI und der freigesetzte säureempfindliche Rest erst im Laufe längerer Zeit (Minuten) durch die Säure vollständig, d. h. irreversibel denaturiert werden, kommt die Spaltungsreaktion wegen der starken Abweichung vom pH-Optimum (aktueller pH 0,2) praktisch schlagartig zum Stillstand. Nach hinreichend langer Dauer der Säureeinwirkung sind nur noch die säurestabilen Inhibitoren in der Perchlorsäure gelöst. Nun wird das denaturierte, ausgefällte Protein abzentrifugiert.

Der Überstand wird mit eingestellter K_2CO_3 - Lösung neutralisiert. Da es sich um kleinste Mengen stark saurer Flüssigkeiten handelt (200 µl), stellt die zuverlässige Neutralisation mit eingestellter K_2CO_3-Lösung hohe Anforderungen hinsichtlich experimenteller Genauigkeit. Wegen des Freiwerdens von Kohlensäure schäumt die Probe. Das entstehende Kaliumperchlorat fällt weitgehend aus, so daß die Ionenstärke im folgenden Enzymtest nicht wesentlich verändert wird. Nach dem Aufschäumen der Kohlensäure wird das ausgefallene $KClO_4$ abzentrifugiert.

Der im Überstand enthaltene säurestabile Inhibitor wird durch Hemmung von Trypsin im BAPA-Test quantitativ erfaßt.

Durch Variation der Zeit zwischen dem Beginn der enzymatischen Spaltung von ITI und der Säurezugabe kann man den zeitlichen Verlauf der Spaltung verfolgen.

6. Denaturierung von Trypsin in Perchlorsäure

Um festzustellen, wie lange die Säureeinwirkung dauern muß, bis die spaltenden Enzyme vollständig denaturiert sind, wird die Haltbarkeit von Trypsin in 6 %-iger Perchlorsäure untersucht. Dazu läßt man auf Trypsinproben unterschiedlich lang Perchlorsäure bei 25°C einwirken. Die Säurekonzentrationen und das übrige Behandlungsverfahren entsprechen den Bedingungen bei den Spaltungsversuchen mit ITI. Einzelheiten sind im experimentellen Teil (Kap. D.I.6) beschrieben.

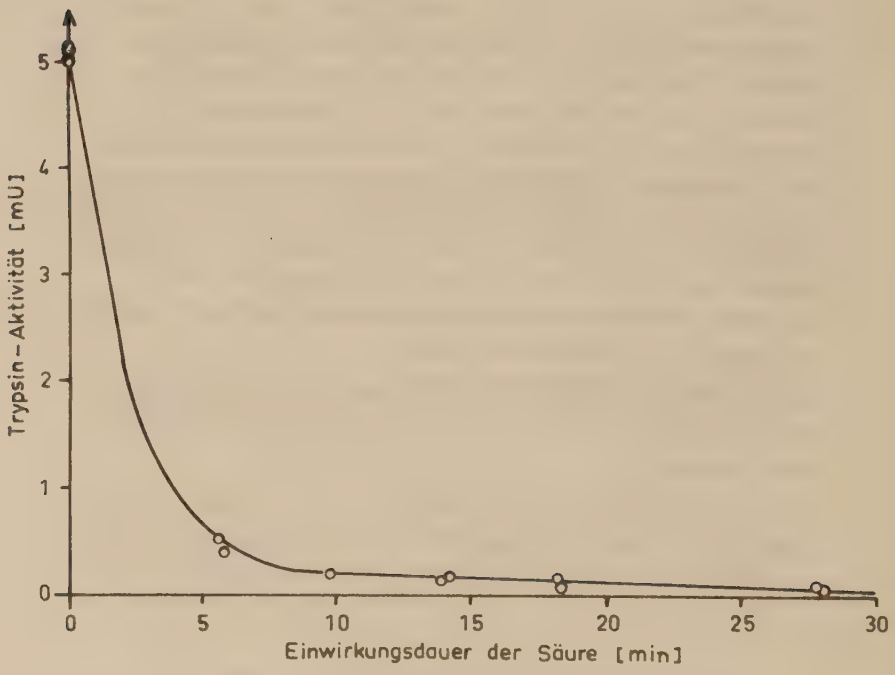


Abb. 4: Trypsin-Aktivität nach verschieden langer Inkubation mit 6 %-iger Perchlorsäure bei 25°C

Um den Einfluß der Fällungsreagentien auf die Trypsin-Aktivität zu messen, werden entsprechende Volumenteile Perchlorsäure mit K_2CO_3 - Lösung neutralisiert. Die in Gegenwart dieser Mischung gemessene Trypsin-Aktivität entspricht im Diagramm (Abb. 4) dem Abszissenwert t=0.

Nach 6 Minuten Säureeinwirkung sind nur noch 10 % des ursprünglich eingesetzten Trypsins nachweisbar. Nach 30 Minuten sind 99 % des Trypsins zerstört.

Bei den folgenden Messungen mit Säurefällung ließ man die Perchlorsäure 30 Minuten lang auf das Enzym-ITI-Gemisch einwirken.

7. Spaltung von Inter-α-Trypsin-Inhibitor durch Trypsin

138 mU Trypsin werden mit 108 mIU ITI in einem Gesamtvolumen von 660 µl inkubiert.

Das molare Verhältnis Trypsin : ITI beträgt somit etwa 1,3. In Vorversuchen ergab sich, daß bei diesem Mischungsverhältnis die ITI-Spaltung in einem bequem meßbaren Geschwindigkeitsbereich abläuft.

Aus dem Inkubat werden zu verschiedenen Zeiten nach Reaktionsbeginn Proben der Säurefällung unterworfen. Nach dem in Kap. B.I.5 beschriebenen Prinzip wird der Gehalt an bis dahin freigesetztem säurestabilem Inhibitor gemessen. Der Überstand, der schließlich zur Trypsin-Hemmung in den BAPA-Test eingesetzt wird, entspricht einem Anteil des Inkubats, der ursprünglich 3,2 mIU ITI enthalten hat. Die Trypsin-Aktivitäten in Anwesenheit der Überstände aus unterschiedlich lang dauernder ITI-Spaltung sind in Abb. 5 wiedergegeben.

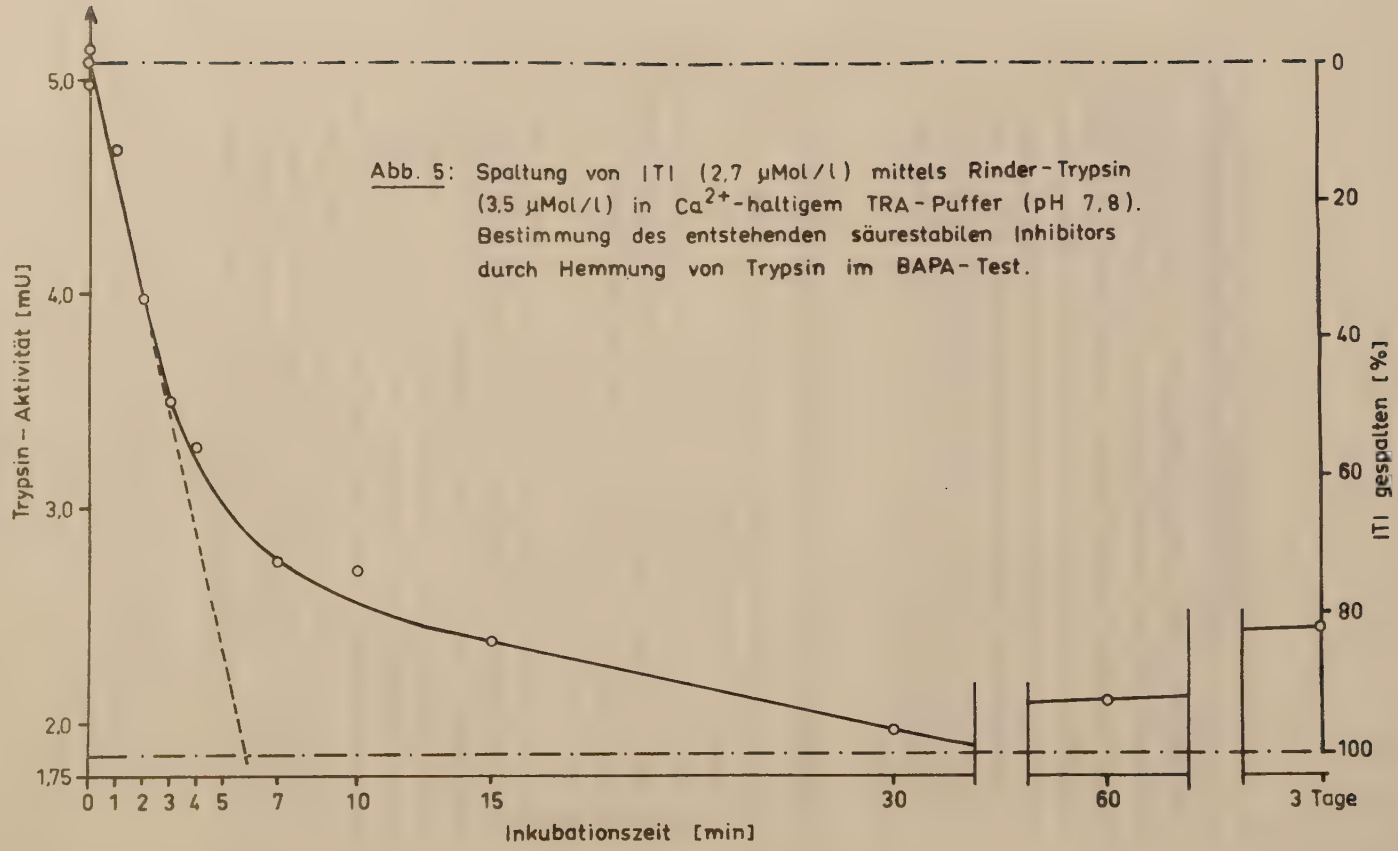


Abb. 5: Spaltung von ITI (2,7 µMol/l) mittels Rinder-Trypsin (3,5 µMol/l) in Ca^{2+}-haltigem TRA-Puffer (pH 7,8). Bestimmung des entstehenden säurestabilen Inhibitors durch Hemmung von Trypsin im BAPA-Test.

Die Trypsin-Aktivität über dem Abszissenwert "Inkubationszeit = 0" wird in Anwesenheit eines inhibitorfreien Perchloratüberstands bestimmt. Somit ist der Einfluß der Reagentien aus der Säurefällung auf die Trypsin-Aktivität bei allen Meßpunkten gleich.

Die Menge des zu verschiedenen Zeitpunkten freigesetzten säurestabilen Inhibitors in mIU läßt sich durch Subtraktion der jeweils gemessenen Trypsin-Aktivität von der Aktivität bei t = 0 (5,1 mU) errechnen.

Wenn der gesamte eingesetzte ITI in säurestabilen Inhibitor umgewandelt ist, muß, falls aus jedem Molekül nativem ITI ein Molekül säurestabiler Inhibitor freigesetzt wird, die Trypsin-Aktivität im BAPA-Test (5,1 - 3,2) mU = 1,9 mU betragen. Diesem sich auf Grund der gewählten Bedingungen ergebenden Wert ist die Angabe "100 % ITI gespalten" auf der rechts in Abb. 5 eingezeichneten Skala zugeordnet.

30 Minuten nach Beginn der tryptischen Spaltung sind (5,1 - 1,96) mIU = 3,14 mIU säurestabiler Inhibitor nachweisbar. Das sind 98 % der Hemmaktivität, die sich theoretisch (s. o.) aus der eingesetzten ITI-Menge errechnet (3,2 mIU). Mit dieser erstaunlich genauen Annäherung an 100 % ist bewiesen, daß Trypsin ITI zu 100 % in säurestabilen Inhibitor spaltet und nicht nur zu 50 %, wie man früher annahm (unveröffentlicht). Dabei wird aus jedem ITI-Molekül ein Molekül säurestabiler Inhibitor freigesetzt. Das hier angewandte Trennverfahren ist so ausgearbeitet, daß der säurestabile Inhibitor die Prozedur übersteht.

Nach 60 Minuten und nach drei Tagen Inkubationszeit wird weniger säurestabiler Inhibitor nachgewiesen als nach 30 Minuten. Dies ist ein Hinweis darauf, daß Trypsin den säurestabilen Inhibitor im Laufe der Zeit in noch kleinere Bruchstücke spaltet, die keine Hemmaktivität mehr besitzen.

Die Aktivität eines Enzyms gegenüber einem bestimmten Substrat ist als Geschwindigkeit des Substratumsatzes bei Reaktionsbeginn definiert. Die Aktivität des Enzyms Trypsin gegenüber dem Substrat ITI wird aus der Steigung der Tangente an den Anfangsteil der Spaltungskurve (Abb. 5) zu 108 mIU pro 5,8 Minuten ermittelt.

108 mIU eingesetzter ITI entsprechen
$108 \text{ mIU} \cdot 1{,}65 \cdot 10^{-11} \frac{\text{Mol}}{\text{mIU}} = 1{,}8 \cdot 10^{-9}$ Mol ITI.

Der Faktor $1{,}65 \cdot 10^{-11} \frac{\text{Mol}}{\text{mIU}}$ stammt aus der Trypsin-Titration mit NPGB (Kap. B.I.2). 1 Mol Trypsin wird durch 1 Mol ITI gehemmt.

Pro Minute werden $\frac{1{,}8}{5{,}8}$ nMol $= 3{,}1 \cdot 10^{-10}$ Mol ITI gespalten.

Bei einem Inkubationsvolumen von 660 µl betrug die ITI-Konzentration während der Spaltungsreaktion
$\frac{1{,}8 \cdot 10^{-9} \text{ Mol}}{0{,}66 \text{ ml}} = 2{,}7$ µM.

Die Anfangsgeschwindigkeit der ITI-Spaltung ist
$\frac{3{,}1 \cdot 10^{-10} \text{ Mol}}{0{,}66 \text{ ml} \cdot \text{min}} = 4{,}7 \cdot 10^{-7} \text{ Mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Zusammenfassung:

Inkubiert man 2,7 µMol/l ITI mit der 1,3-fachen molaren Konzentration Trypsin bei 25°C, so spaltet das Trypsin aus dem nativen ITI säurestabilen Inhibitor mit der Geschwindigkeit von $4{,}7 \cdot 10^{-7}$ Mol $\cdot$ l^{-1} $\cdot$ min^{-1} ab.

8. Einstellung des Hemmgleichgewichts zwischen Trypsin und säurestabilem Inhibitor

Beim Nachweis des säurestabilen Inhibitors durch Hemmung von Trypsin im BAPA-Test ist das Enzym-Inhibitor-Gemisch vor der Substratzugabe 15 Minuten lang inkubiert worden. Durch Variation der Inkubationszeit wird

gezeigt, daß 15 Minuten für eine vollständige Zusammenlagerung von Enzym und Inhibitor ausgereicht haben.

Säurestabiler Inhibitor wird durch 30-minütige Inkubation von 346 mU Trypsin mit 269 mIU ITI bei 25°C hergestellt und nach dem in Kap. B.I.5 beschriebenen Prinzip isoliert.

Die Trypsin-Aktivitäten nach verschieden langer Inkubation mit jeweils 4,4 mIU Inhibitor pro Küvette sind in Abb. 6 wiedergegeben.

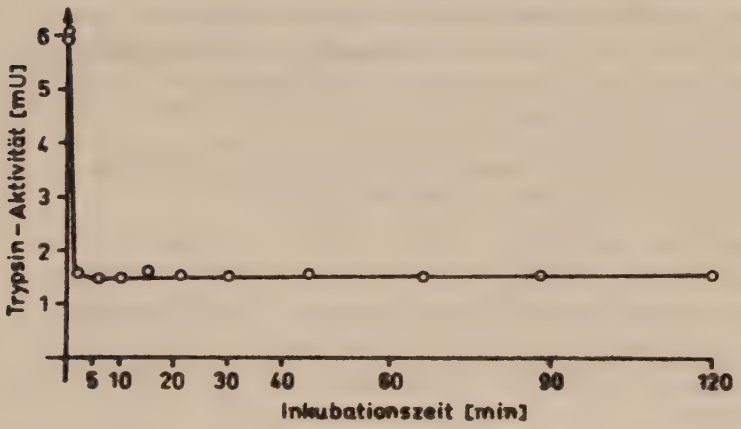


Abb. 6: Einstellung des Hemmgleichgewichts zwischen Trypsin und säurestabilem Inhibitor

Spätestens nach 6-minütiger Inkubation ist die maximale Trypsin-Hemmung erreicht. Die Inkubationszeit von 15 Minuten war also ausreichend.

9. Anteil des ohne tryptische Spaltung im ITI-Präparat vorhandenen säurestabilen Inhibitors

Um zu klären, ob die verwendete ITI-Stammlösung wirklich reinen nativen ITI enthält, oder ob möglicherweise ein Teil bereits durch unbekannte proteolytische Vorgänge gespalten worden ist, wird der evtl. vorhandene säurestabile Inhibitor durch die beschriebene Säurefällung aus ITI-Stammlösung ohne vorherige Trypsinzugabe abgetrennt.

Zum Inhibitornachweis durch Trypsin-Hemmung im BAPA-Test wird ein Überstand verwendet, der theoretisch (bei 100 %-iger ITI-Spaltung) pro Meßküvette 26,9 mIU Inhibitor enthalten müßte.

Tatsächlich weist man in vier Messungen im Mittel 1,95 mIU Inhibitor pro Küvette nach.

Also sind $\frac{1{,}95\ \text{mIU}}{26{,}9\ \text{mIU}} \cdot 100\,\% = 7\,\%\ (\pm 1\,\%)$ des Inter-α-Trypsin-Inhibitors bereits in säurestabilen Inhibitor umgewandelt. Man muß davon ausgehen, daß Proteinasen im Ausgangsmaterial dafür verantwortlich sind oder Spaltung während der Isolierung des ITI aus dem Serum erfolgt.

II. Messungen mit Schweine-Plasmin

1. Bestimmung der Aktivität von Schweine-Plasmin im BAPA-Test

Schweine-Plasmin läßt sich wie Trypsin im BAPA-Test nachweisen (vgl. Kap. B.I.1). Experimentelle Details: Siehe Kap. D.II.1.

Die spezifische Aktivität ergibt sich zu

15,26 U/g Einwaage.

2. Molarität des Schweine-Plasmins

Die Molarität des Schweine-Plasmins wird durch Hemmung mit Aprotinin ermittelt. Dessen Molarität ist bereits durch Trypsin-Hemmung gemessen worden (Kap. B.I.3):

1 Gramm Aprotinin-Einwaage entspricht $9 \cdot 10^{-5}$ Mol Aprot.

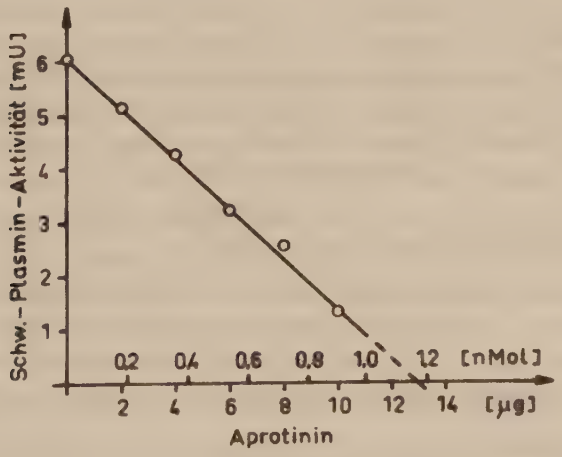


Abb. 7: Hemmung von Schweine-Plasmin durch Aprotinin

6,08 mU Schweine-Plasmin werden - linear extrapoliert - durch 13 μg Aprotinin $\hat{=}$ 1,17 nMol vollständig gehemmt.

1 U Schweine-Plasmin im BAPA-Test entspricht also

$\frac{1,17}{6,08}$ μMol = $1,9 \cdot 10^{-7}$ Mol.

3. Hemmgleichgewicht zwischen Schweine-Plasmin und Aprotinin

Die Einstellung des Hemmgleichgewichts zwischen Schweine-Plasmin und 5 μg Aprotinin ist in Abb. 8 dargestellt.

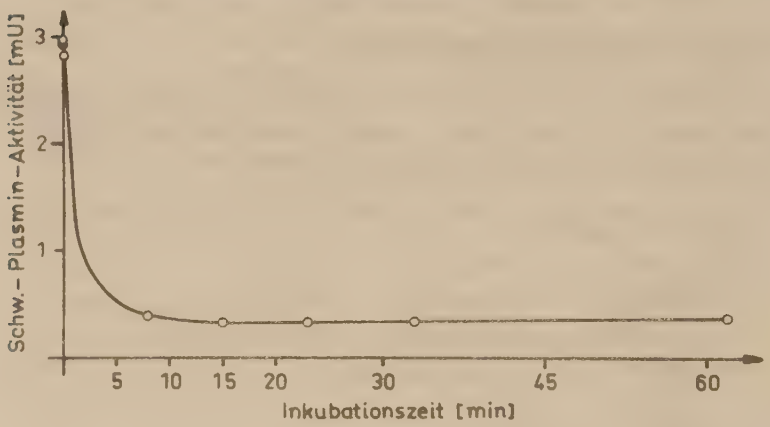


Abb. 8: Einstellung des Hemmgleichgewichts zwischen Schweine-Plasmin und Aprotinin

Nach 15 Minuten Inkubationszeit ist das Schweine-Plasmin maximal durch Aprotinin gehemmt. Das entspricht der Inkubationszeit, die bei der Molaritätsbestimmung des Schweine-Plasmins gewählt worden ist.

4. Hemmung von Schweine-Plasmin durch nativen ITI

Nach 15-minütiger Inkubation mit ITI wird die Aktivität von Schweine-Plasmin im BAPA-Test gemessen.

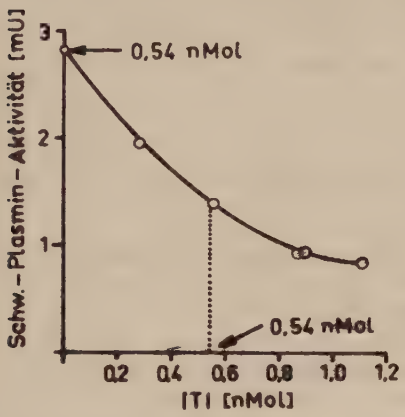


Abb. 9:
Hemmung von 0,54 nMol Schweine-Plasmin durch Inter-α-Trypsin-Inhib.

Am Anfangsteil der Hemmkurve befindet sich das Schweine-Plasmin gegenüber dem ITI im Überschuß. Es kann daher vorerst nicht ausgeschlossen werden, daß die beobachtete Plasmin-Hemmung von niedermolekularem Inhibitor herrührt, der während der 15-minütigen Inkubationszeit möglicherweise aus ITI abgespalten wird. Dieser Frage wird in Kap. B.II.10 nachgegangen.

Durch die äquimolare Menge ITI, d. h. durch 0,54 nMol ITI, wird die Plasminaktivität von 2,82 mU auf 1,42 mU gehemmt, also auf 50 % des Ausgangswerts.

5. Hemmgleichgewicht zwischen Schweine-Plasmin und ITI

Die Einstellung des Hemmgleichgewichts zwischen 0,54 nMol Schweine-Plasmin und 1,11 nMol Inter-α-Trypsin-Inhibitor ist in Abb. 10 dargestellt.

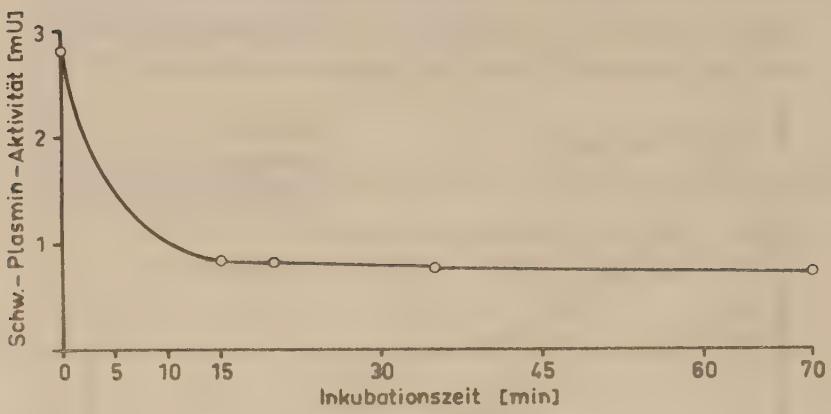


Abb. 10: Hemmgleichgewicht zwischen 0,54 nMol Schweine-Plasmin und 1,11 nMol Inter-α-Trypsin-Inhibitor

Die Plasmin-Hemmung scheint nach 15 Minuten Inkubationszeit noch geringfügig zuzunehmen.

6. Denaturierung des Schweine-Plasmins durch Perchlorsäure

Analog dem Versuch mit Trypsin (Kap. B.I.6) wird untersucht, wieviel Schweine-Plasmin-Aktivität nach 30-minütiger Einwirkung von 6 %-iger Perchlorsäure bei 25°C noch im BAPA-Test nachweisbar ist. Von der eingesetzten Aktivität (2,9 mU) ist nach 30 Minuten nichts mehr meßbar.

7. Spaltung von ITI durch Schweine-Plasmin

2,3 nMol Schweine-Plasmin werden mit 1,8 nMol ITI (≙ 1o8 mIU) in einem Gesamtvolumen von 660 µl inkubiert. Die Enzym- und ITI-Konzentration bei der Spaltungsreaktion sind gleich den bei der ITI-Spaltung durch Trypsin eingesetzten Konzentrationen (Kap. B.I.7). Das Enzym-ITI-Verhältnis ist wieder 1,3.

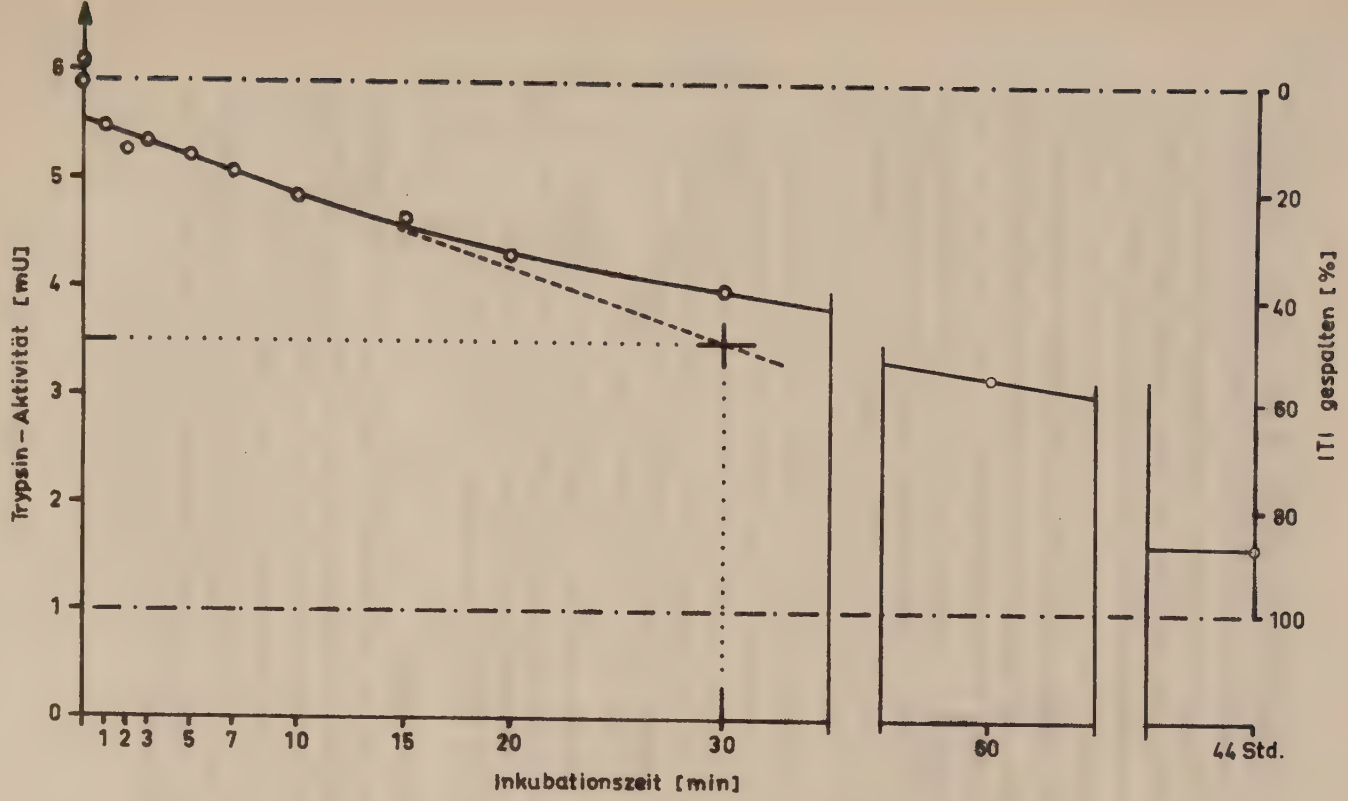


Abb. 11: Spaltung von ITI (2,7 µMol/l) mittels Schweine-Plasmin (3,5 µMol/l). Bestimmung des entstehenden säurestabilen Inhibitors durch Hemmung von Trypsin im BAPA-Test.

Nach verschieden langen Spaltzeiten wird der entstandene säurestabile Inhibitor durch Hemmung von Trypsin im BAPA-Test nachgewiesen. Die Trypsin-Aktivitäten mit Zusatz des nach verschiedenen Reaktionszeiten freigesetzten säurestabilen Inhibitors sind in Abb. 11 dargestellt.

Bei der Inkubationszeit $t = 0$ ist wieder die Trypsin-Aktivität in Anwesenheit eines inhibitorfreien Perchloratüberstands eingetragen.

44 Stunden nach Inkubationsbeginn mit Schweine-Plasmin werden 4,25 mIU säurestabiler Inhibitor pro Küvette nachgewiesen. Das sind 87 % von theoretisch erreichbaren 4,9 mIU.

Zur Ermittlung der Spaltgeschwindigkeit von Schweine-Plasmin gegenüber ITI wird wieder die Steigung der Tangente im Anfangsteil der Spaltkurve (Abb. 11) bestimmt. In 30 Minuten werden 2,05 mIU von theoretisch erreichbaren 4,9 mIU säurestabilen Inhibitors freigesetzt. Das sind $\frac{2,05}{4,9} \cdot 100\,\% = 42\,\%$.

Im Inkubationsgemisch entstehen also von $\frac{1,8\ \text{nMol}}{0,66\ \text{ml}} =$ $= 2,7\ \mu\text{M}$ (100 %) innerhalb von 30 Minuten $1,16\ \mu\text{M}$ (42 %) säurestabiler Inhibitor. Pro Minute werden also $3,9 \cdot 10^{-8}\ \frac{\text{Mol}}{\text{l}}$ ITI gespalten.

Zusammenfassung:

Inkubiert man 2,7 µMol/l ITI mit der 1,3-fachen molaren Konzentration Schweine-Plasmin bei 25°C, so spaltet das Plasmin aus dem nativen ITI säurestabilen Inhibitor ab mit der Geschwindigkeit $3,9 \cdot 10^{-8}\ \text{Mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Die Spaltgeschwindigkeit von Schweine-Plasmin gegenüber ITI ist also um eine Zehnerpotenz niedriger als die von Rinder-Trypsin.

8. Hemmung von Schweine-Plasmin durch trypsinolytisch freigesetzten säurestabilen Inhibitor

Es ist anzunehmen, daß Trypsin und Plasmin den ITI an verschiedenen Stellen des Moleküls spalten. Daher ist eine Untersuchung angebracht, ob die jeweils entstehenden Spaltprodukte sich in ihren Hemmeigenschaften untereinander oder vom nativen ITI unterscheiden.

Zunächst wird säurestabiler Inhibitor durch Trypsinolyse von ITI nach dem in Kap. B.I.8 angegebenen Verfahren hergestellt. Der Überstand enthält schließlich 196 $\frac{mIU}{ml}$ (Hemmaktivität gegenüber Trypsin) = 3,2 $\frac{\mu Mol}{l}$ Inhibitor. Abb. 12 zeigt die Plasmin-Aktivitäten im BAPA-Test in Gegenwart verschiedener Mengen säurestabilen Inhibitors (durchgezogene Kurve).

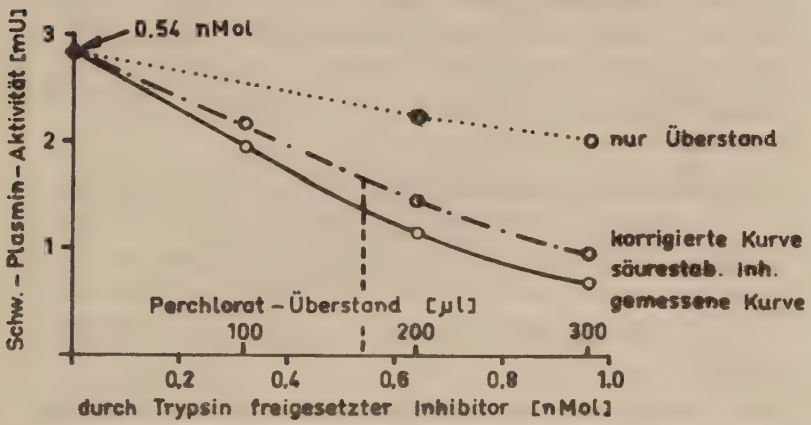


Abb. 12: Hemmung von 0,54 nMol Schweine-Plasmin durch trypsinolytisch freigesetzten säurestabilen Inhibitor.
—— = gemessene Hemmkurve
····· = Plasmin-Aktivitäten in Anwesenheit entsprechender Volumina inhibitorfreien Perchloratüberstands
·—·— = korrigierte Hemmkurve nach Berücksichtigung der Aktivitätsminderung durch den Perchloratüberstand

Gleichzeitig mit der Hemmkurve werden die Plasmin-Aktivitäten in Anwesenheit entsprechender Volumina inhibitorfreien Perchloratüberstands gemessen (punktierte Kurve in Abb. 12). In Gegenwart der Fällungsreagentien wird eine Aktivitätsminderung des Plasmins beobachtet. Um den Perchlorat-Einfluß zu eliminieren, werden die jeweils gemessenen Plasmin-Aktivitäten der Hemmkurve korrigiert (Strich-Punkt-Kurve in Abb. 12).

In Anwesenheit von 0,54 nMol säurestabilem Inhibitor beträgt die korrigierte Plasmin-Aktivität 1,65 mU, also $\frac{1,65}{2,85} \cdot 100\,\% = 58\,\%$ des Ausgangswerts.

9. Hemmung von Schweine-Plasmin durch plasminolytisch gewonnenen säurestabilen Inhibitor

Zur Herstellung des säurestabilen Inhibitors werden 4,5 nMol Schweine-Plasmin und 4,2 nMol ITI ($\hat{=}$ 258 mIU Hemmaktivität gegenüber Trypsin) in einem Gesamtvolumen von 490 µl bei 25°C 24 Stunden lang inkubiert.

Danach wird der entstandene säurestabile Inhibitor gemäß Kap. B.I.5 abgetrennt.

Im Überstand müssen schließlich 160 mIU Inhibitor/ml $\hat{=}$ 2,6 nMol/ml enthalten sein, wie sich aus der eingesetzten Inhibitormenge unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren ausrechnen läßt. Tatsächlich werden 105 % dieser Konzentration im Trypsin-Hemmtest nachgewiesen.

Die Hemmung von Schweine-Plasmin im BAPA-Test durch so hergestellten Inhibitor ist in Abb. 13 aufgetragen (durchgezogene Kurve).

Die punktiert gezeichnete Kurve in Abb. 13 zeigt wieder die Plasmin-Aktivität in Gegenwart entsprechender Volumina inhibitorfreien Perchloratüberstands.

Nach Berücksichtigung der Aktivitätsminderung durch Perchlorat ergibt sich die korrigierte Hemmkurve (Strich-Punkt-Kurve in Abb. 13).

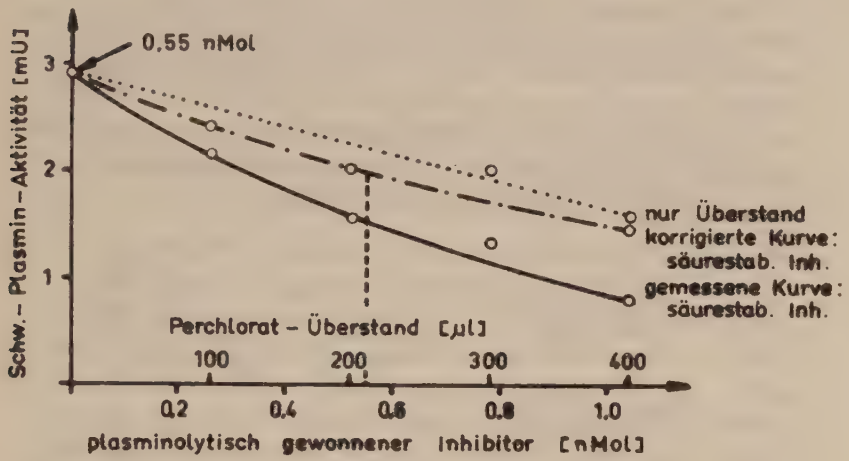


Abb. 13: Hemmung von 0,55 nMol Schweine-Plasmin durch plasminolytisch freigesetzten säurestabilen Inhibitor.
——= gemessene Hemmkurve
·····= Plasmin-Aktivitäten in Anwesenheit entsprechender Volumina inhibitorfreien Perchloratüberstands
·—·= korrigierte Hemmkurve nach Berücksichtigung der Aktivitätsminderung durch den Perchloratüberstand

Durch 0,55 nMol Inhibitor wird die Plasmin-Aktivität von ursprünglich 2,91 mU auf 1,99 mU gehemmt. Das sind $\frac{1,99}{2,91} \cdot 100\,\% = 68\,\%$ des Ausgangswerts.

Vergleicht man die Hemmung von Schweine-Plasmin durch äquimolare Mengen ITI (auf 50 % der Ausgangsaktivität), trypsinolytisch freigesetzten (auf 58 %) und plasminolytisch gewonnenen säurestabilen Inhibitor (auf 68 %) mit der Hemmung von Trypsin durch äquimolare ITI-Mengen (auf 5 % der Ausgangsaktivität), so sieht man, daß Plasmin schwächer gehemmt wird als Trypsin.

10. Überprüfung der Hemmaktivität von nativem Inter-α-Trypsin-Inhibitor

Bei der Messung der Hemmkurve von Schweine-Plasmin durch nativen ITI (Kap. B.II.4) konnte bis jetzt nicht ausgeschlossen werden, daß die nachgewiesene Plasmin-Hemmung möglicherweise gar nicht von nativem ITI herrührt, sondern von säurestabilem Inhibitor, welcher während der 15-minütigen Inkubation mit Schweine-Plasmin aus ITI abgespalten worden ist.

Zur Klärung dieser Frage werden nochmals Proben mit den gleichen Mengen Schweine-Plasmin, ITI und Puffer angesetzt wie in Kap. B.II.4. Nach genau 15 Minuten wird die Inkubation durch Zugabe von Perchlorsäure beendet. Der zu diesem Zeitpunkt entstandene säurestabile Inhibitor wird nach Abtrennung gemäß Kap. B.I.5 durch Hemmung von Trypsin im BAPA-Test nachgewiesen (Abb. 14).

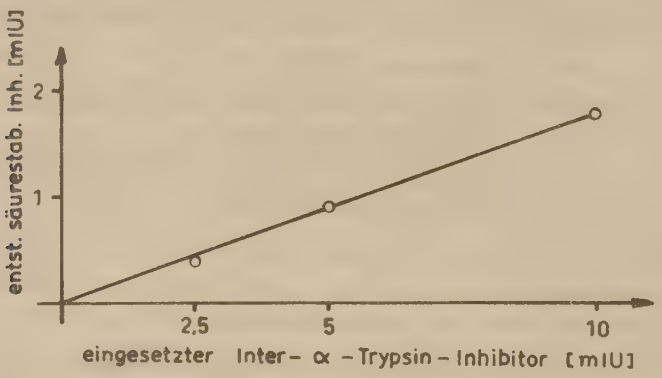


Abb. 14: Entstandener säurestabiler Inhibitor nach 15-minütiger Inkubation von 0,54 nMol Schweine-Plasmin mit verschiedenen Mengen ITI

Unterschiedliche Mengen ITI (0,28, 0,56 und 1,12 nMol) werden mit einer konstanten Enzymmenge (0,54 nMol) inkubiert. Trotz der verschiedenen molaren Verhältnisse

sind nach 15 Minuten Inkubation jeweils etwa 18 % des eingesetzten ITI als säurestabiler Inhibitor nachweisbar.

In Abb. 15 ist die aus Abb. 9 bekannte Hemmkurve von ITI gegenüber Schweine-Plasmin nochmals eingetragen (durchgezogene Kurve).

Zusätzlich ist die Plasmin-Hemmung eingezeichnet, die sich ergäbe, wenn nur die 18 % freigesetzter säurestabiler Inhibitor hemmen würden (Strich-Punkt-Kurve).

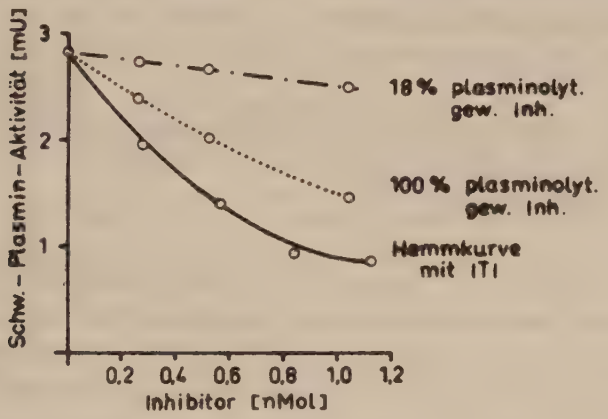


Abb. 15: Vergleich der Hemmkurven von ITI und von plasminolytisch gewonnenem säurestabilem Inhibitor gegenüber Schweine-Plasmin.
——= Hemmung durch ITI (aus Abb. 9)
·····= Hemmung durch plasminolytisch freigesetzten säurestabilen Inhibitor (aus Abb. 13)
·—·= Anteil an der Plasmin-Hemmung von den 18 % während der Inkubation entstandenem säurestabilem Inhibitor (rechnerisch aus der punktiert gezeichneten Kurve ermittelt).

Ein Vergleich der beiden Hemmkurven zeigt, daß die Hemmung durch die 18 % plasminolytisch entstandenen Inhibitors unwesentlich ist im Vergleich zur gemessenen Hemmung durch nativen ITI. Somit ist sichergestellt, daß nativer ITI die Hemmung in Kap. B.I.4 (Abb. 9) bewirkt hat.

III. Messungen mit Human-Plasmin

1. Aktivierung von Human-Plasminogen mit Streptokinase

Der Inhalt einer Flasche Test-Plasminogen, human, wird entsprechend dem Aktivierungsvorschlag auf der Packungsbeilage[3] mit 107 IE Streptokinase aktiviert. Die Lösung enthält dann ca. 25 CTA-Einheiten Human-Plasmin in einem Volumen von 1050 µl.

2. Aktivität des Human-Plasmins

Ein Teil der in B.III.1 hergestellten Plasmin-Lösung wird mit 25 %-igem Glyzerin auf das 20-fache Volumen verdünnt. Diese Plasmin-Lösung enthält dann ca. 1,25 CTA-Einheiten pro Milliliter.

Die Aktivität des Human-Plasmins wird mit dem KABI-Substrat S-2251 gemessen[4]. Es besitzt die Zusammensetzung H-D-Val-Leu-Lys-pNA · 2 HCl. Human-Plasmin spaltet daraus den gelben Farbstoff p-Nitroanilin (pNA) ab, der auch im BAPA-Test freigesetzt wird und bei 405 nm den Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{405} = 9{,}95 \cdot 10^3\ l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ besitzt.

Plasmin ist nicht das einzige Enzym, welches dieses Substrat spaltet, aber es liefert die größte relative Aktivität, wie folgender Vergleich[4] zeigt:

---

3) Behringwerke, Frankfurt/Main:
Packungsbeilage / Aktivierungsvorschlag zum Test-Plasminogen, human.

4) KABI-Werke, Mölndal (Schweden):
Firmenprospekt über das Substrat S - 2251.

Enzym	rel. Aktivität gegenüber S-2251
Plasmin	500
Plasminogen-Streptokinase	750
Thrombin	1
Trypsin	15
Urokinase	20

Die Michaelis-Konstante K_M liegt bei $3 \cdot 10^{-4}$ M für Plasmin bzw. $2 \cdot 10^{-4}$ M für Plasminogen-Streptokinase[4]. S - 2251 hat ein Molekulargewicht von 551,5. Im Test beträgt die Substratkonzentration $3,6 \cdot 10^{-4}$ M $= 1,8 \cdot K_M$.

Die spezifischen Aktivitäten des Human-Plasmin ergeben sich zu 56,2 mU/ml in der 1:20 - Verdünnung (B.III.2) bzw. 1,124 U/ml in der Plasmin-Stammlösung (B.III.1).

3. Molarität des Human-Plasmins

Die Molarität des Human-Plasmins wird analog Kap. B.II.2 durch Hemmung mit Aprotinin bestimmt.

Inkubationszeit: 15 Minuten.

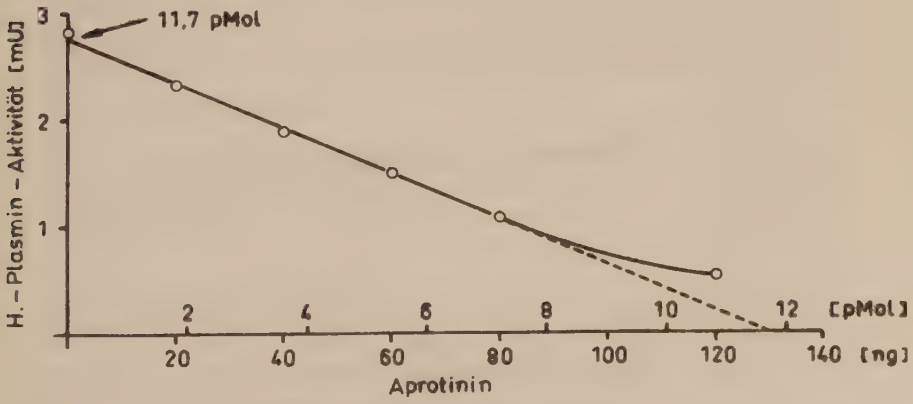


Abb. 16: Hemmung von Human-Plasmin durch Aprotinin

2,75 mU Plasmin-Aktivität werden - linear extrapoliert - durch 130 ng ($\hat{=}$ 11,7 pMol) Aprotinin vollständig gehemmt.

1 mU Plasmin-Aktivität wird gehemmt durch

$$\frac{1,17}{2,75} \cdot 10^{-11} \text{ Mol} = 4,3 \text{ pMol Aprotinin.}$$

1 U Plasmin-Aktivität gegenüber S-2251 entspricht 4,3 nMol aktivem Enzym.

Somit ergibt sich für die molaren Konzentrationen

a) der Plasmin-Verdünnung 1:20 (Kap. B.III.2)

$$c_a = 4,3 \frac{\text{pMol}}{\text{mU}} \cdot 56,2 \frac{\text{mU}}{\text{ml}} = 2,4 \cdot 10^{-10} \text{ Mol / ml}$$

b) der Plasmin-Stammlösung (aus Kap. B.III.1)

$$c_b = 4,3 \frac{\text{nMol}}{\text{U}} \cdot 1,124 \frac{\text{U}}{\text{ml}} = 4,8 \text{ nMol / ml.}$$

Die Faktoren 56,2 mU / ml bzw. 1,124 U / ml sind aus Kap. B.III.2 übernommen.

4. Hemmung von Human-Plasmin durch nativen Inter-α-Trypsin-Inhibitor

Zur Hemmung von jeweils 8,7 pMol Human-Plasmin wird eine ITI-Verdünnung mit einer Konzentration von 4,4 $\frac{\text{nMol}}{\text{ml}}$ ITI eingesetzt. Inkubationszeit: 15 Minuten.

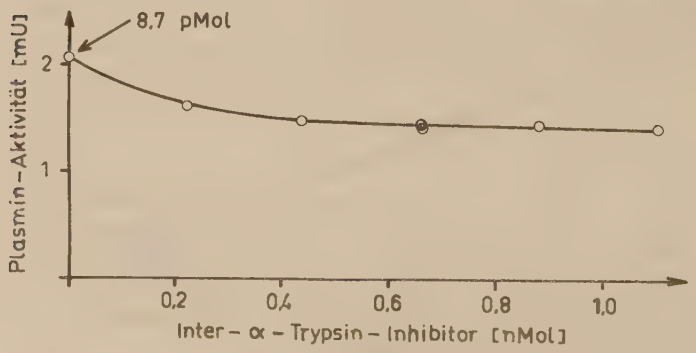


Abb. 17: Hemmung von 8,7 pMol Human-Plasmin durch ITI

Wegen des schnellen Zerfalls von Human-Plasmin und wegen der Kostspieligkeit der Substanzen wird auf eine exakte Messung der Hemmgleichgewichts-Einstellung verzichtet.

Die Human-Plasmin-Aktivität in Anwesenheit von 0,66 nMol ITI beträgt 1,45 mU (nach 5 min Inkubation) bzw. 1,40 mU (nach 40 min Inkubation). Diese Werte stimmen untereinander und mit den übrigen Meßpunkten der Hemmkurve so gut überein, daß man die 15 Minuten Inkubationszeit als ausreichend betrachten kann.

8,7 pMol Human-Plasmin werden durch die 130-fache molare Menge ITI (1,1 nMol) nur um 32 % gehemmt. Die Hemmung von Human-Plasmin durch nativen ITI ist also nur sehr schwach.

5. Spaltung von ITI durch Human-Plasmin

2,3 nMol Human-Plasmin werden mit 1,8 nMol ITI ($\hat{=}$ 108 mIU Hemmaktivität gegenüber Trypsin) bei 25°C und pH 7,4 in einem Gesamtvolumen von 660 µl inkubiert. Das molare Verhältnis Plasmin : ITI beträgt 1,3.

Analog Kap. B.I.5 wird zu verschiedenen Zeiten nach Reaktionsbeginn der entstandene säurestabile Inhibitor abgetrennt und durch Hemmung von Trypsin im BAPA-Test nachgewiesen (Abb. 18).

Als Trypsin-Aktivität über dem Abszissenwert "Inkubationszeit = 0" wird wieder die Aktivität in Anwesenheit eines inhibitorfreien Perchloratüberstands in die Spaltungskurve (Abb. 18) eingezeichnet.

Nach 60 Minuten werden (5,5 - 1,91) mIU = 3,59 mIU säurestabiler Inhibitor von insgesamt erreichbaren 4,9 mIU in der Küvette nachgewiesen. Das sind 73 %. Danach läuft die Spaltung langsamer ab. Nach 20 Stunden Inkubation

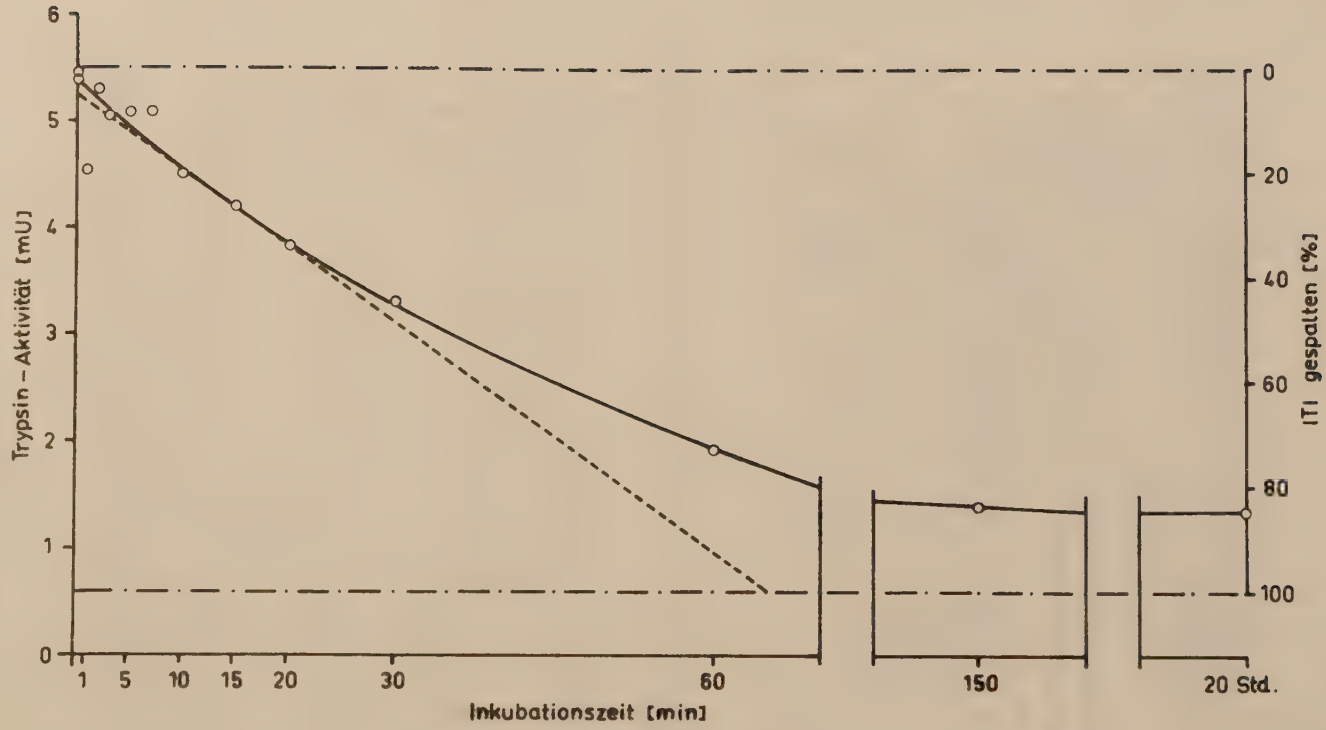


Abb. 18: Spaltung von ITI (2,7 µMol/l) mittels Human-Plasmin (3,5 µMol/l). Bestimmung des entstehenden säurestabilen Inhibitors durch Hemmung von Trypsin im BAPA-Test.

von Human-Plasmin und ITI sind (5,5 - 1,35) mIU = 4,15 mIU säurestabiler Inhibitor in der Küvette, d. h. 85 % des eingesetzten ITI sind zu diesem Zeitpunkt gespalten.

Die Spaltgeschwindigkeit wird wieder aus der Steigung der Tangente am Anfangsteil der Spaltkurve (Abb. 18) berechnet. Danach werden innerhalb 30 Minuten (5,25 - 3,1) mIU = 2,15 mIU säurestabiler Inhibitor im BAPA-Test nachgewiesen. Das sind $\frac{2,15}{4,9} \cdot 100\,\% = 44\,\%$ des aus der eingesetzten Menge ITI berechneten Inhibitors.

Also werden innerhalb 30 Minuten 0,44 · 1,8 nMol ITI = = 0,79 nMol ITI gespalten. Pro Minute setzt das Human-Plasmin dann $\frac{0,79\ \text{nMol}}{30\ \text{min}} = 2,6 \cdot 10^{-11}\ \frac{\text{Mol}}{\text{min}}$ säurestabilen Inhibitor frei.

Die zugehörige pro Minute entstehende Konzentration säurestabilen Inhibitors ist somit $4,0 \cdot 10^{-8}\ \text{Mol} \cdot l^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Zusammenfassung:

Inkubiert man 2,7 µMol/l ITI mit der 1,3-fachen molaren Konzentration Human-Plasmin bei 25°C, so spaltet das Enzym aus dem nativen ITI säurestabilen Inhibitor ab mit der Geschwindigkeit $4,0 \cdot 10^{-8}\ \text{Mol} \cdot l^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Es fällt eine erstaunlich genaue Übereinstimmung zwischen den Spaltgeschwindigkeiten von Schweine- und Human-Plasmin auf.

6. Hemmung von Human-Plasmin durch trypsinolytisch entstandenen säurestabilen Inhibitor

Durch Einwirkung von Trypsin auf Inter-α-Trypsin-Inhibitor wird nach der in Kap. B.I.8 angegebenen Vorschrift das säurestabile Bruchstück hergestellt. Mittels Hemmung von Trypsin im BAPA-Test ermittelt man die Inhibitorkonzentration im Überstand nach der Säurefällung zu 2,9 µMol/l.

Um den Einfluß der Fällungsreagentien auf die Geschwindigkeit der Spaltung des Plasminsubstrats S - 2251 konstant zu halten, wird bei allen für die Hemmkurve nötigen Messungen das gleiche Volumen Fällungsreagentien pro Küvette zugesetzt. Variation der Inhibitorkonzentration wird erreicht, indem man den inhibitorhaltigen Überstand mit inhibitorfreiem Perchloratüberstand zu konstantem Volumen auffüllt.

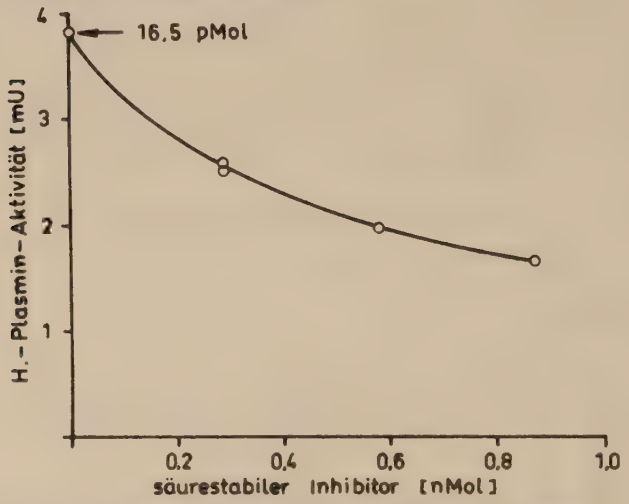


Abb. 19: Hemmung von 16,5 pMol Human-Plasmin durch trypsinolytisch freigesetzten säurestabilen Inhibitor

Aus der Hemmkurve (Abb. 19) sieht man, daß 16,5 pMol Human-Plasmin durch 53-fachen molaren Überschuß von trypsinolytisch freigesetztem säurestabilem Inhibitor nur um 57 % gehemmt werden.

Zur Überprüfung einer ausreichenden Inkubationszeit werden die Human-Plasmin-Aktivitäten nach 15-minütiger und nach 40-minütiger Inkubation mit 0,29 nMol trypsinolytisch freigesetztem Inhibitor bestimmt.

Die Plasmin-Aktivitäten ergeben sich zu 2,58 mU (nach 15 Minuten Inkubation) und 2,51 mU (nach 40 Minuten Inkubation).

Die Hemmaktivität in der Küvette nach 15 Minuten Inkubationszeit (1,25 mIU) ist nur um 5 % niedriger als die Hemmaktivität nach 40 Minuten Inkubation (1,32 mIU). Die Differenz liegt innerhalb der Meßgenauigkeit.

7. Hemmung von Human-Plasmin durch plasminolytisch entstandenen säurestabilen Inhibitor

Zur Herstellung von plasminolytisch gewonnenem säurestabilem Inhibitor werden 1,65 nMol Human-Plasmin mit 1,8 nMol ITI bei pH 7,4 17 Stunden lang inkubiert. Nach Durchführung aller Manipulationen wird durch Hemmung von Trypsin im Überstand eine Inhibitorkonzentration von 1,1 nMol/ml nachgewiesen.

Der Einfluß der Fällungsreagentien auf die Spaltgeschwindigkeit des Plasminsubstrats S - 2251 wird auf die gleiche Weise wie in Kap. B.III.6 eliminiert.

Als Inkubationszeit werden wieder 15 Minuten gewählt.

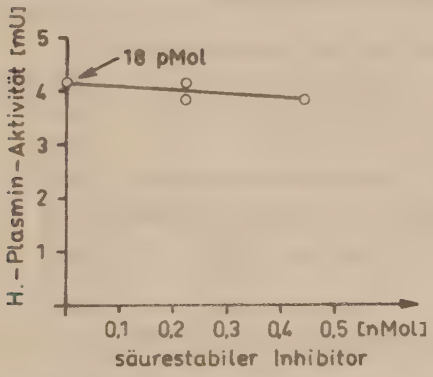


Abb. 20:
Hemmung von 18 pMol Human-Plasmin durch plasminolytisch gewonnenen säurestabilen Inhibitor

Wie man aus der Hemmkurve (Abb. 20) sieht, werden 18 pMol Human-Plasmin durch 440 pMol plasminolytisch freigesetzten Inhibitor (= 25-fache molare Menge) nur um 8% gehemmt.

IV. Messungen mit Schweine-Pankreas-Kallikrein

1. Bestimmung der Kallikrein-Aktivität

Die Aktivität des Schweine-Pankreas-Kallikreins wird mit dem KABI-Substrat S - 2266 gemessen. Es hat die Zusammensetzung H-D-Val-Leu-Arg-pNA · 2 HCl.

Drüsen-Kallikreine spalten daraus p-Nitroanilin (pNA) ab, wodurch ein Extinktionsanstieg bei 405 nm bewirkt wird ($\varepsilon_{405} = 9{,}950 \cdot 10^3\ l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$).

Die Michaelis-Konstante K_M des Substrats gegenüber Pankreas-Kallikrein beträgt $3 \cdot 10^{-5}$ M. Im Test wird das Substrat entsprechend der Empfehlung im Firmenprospekt[5] in der Konzentration $1{,}6 \cdot 10^{-4}$ M = $5{,}3 \cdot K_M$ angewandt.

Bei Verwendung von 1,65 µg Kallikrein mißt man eine Aktivität von 4,5 mU in 1 ml Küvetteninhalt im photometrischen Test. Die spezifische Aktivität des Schweine-Pankreas-Kallikreins ergibt sich damit zu 2,7 U/mg.

2. Molarität des Schweine-Pankreas-Kallikreins

Der molare Gehalt der Schweine-Pankreas-Kallikrein-Lösung wird wieder durch Hemmung mit Aprotinin ermittelt.

Die Inkubationszeit beträgt 15 Minuten.

4,65 mU Kallikrein werden - linear extrapoliert - durch 0,592 µg Aprotinin ($\hat{=}$ 53 pMol) vollständig gehemmt.

1 mU Kallikrein-Aktivität entspricht $\frac{5{,}3}{4{,}65} \cdot 10^{-11}$ Mol = = 11,5 pMol.

1 U Schweine-Pankreas-Kallikrein $\hat{=}$ 11,5 nMol Kallikrein.

---

5) KABI-Werke, Mölndal (Schweden): Firmenprospekt über das Substrat S - 2266.

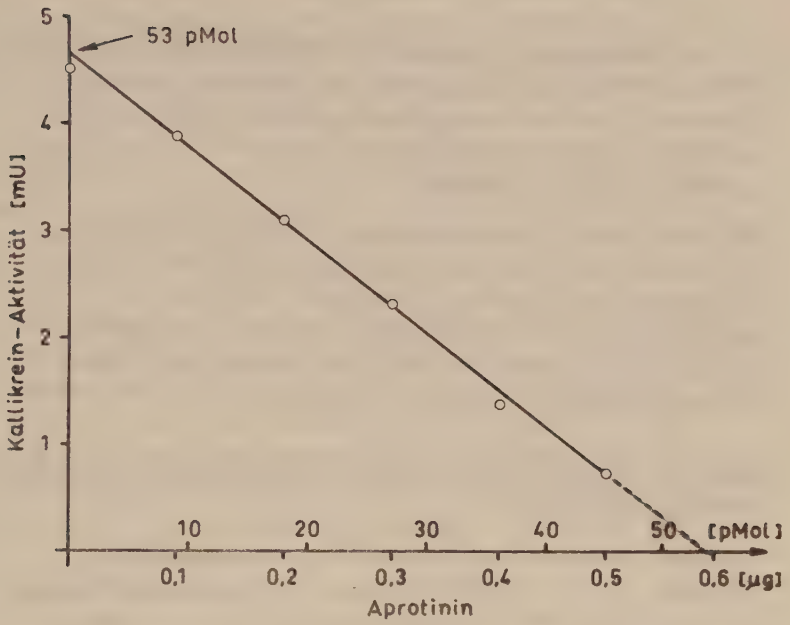


Abb. 21: Hemmung von Schweine-Pankreas-Kallikrein durch Aprotinin

3. Hemmgleichgewicht zwischen Schweine-Pankreas-Kallikrein und Aprotinin

Für die Hemmung von 4,5 mU Kallikrein durch 0,4 µg Aprotinin wird die Einstellung des Hemmgleichgewichts gemessen.

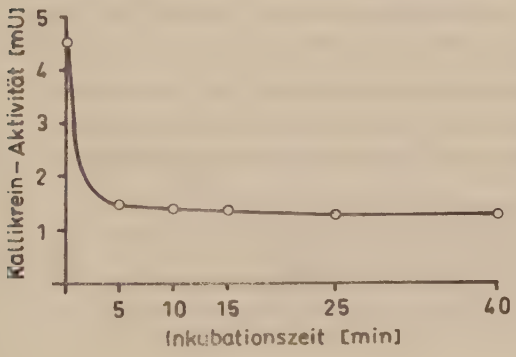


Abb. 22:
Einstellung des Hemmgleichgewichts zwischen Schweine-Pankreas-Kallikrein und Aprotinin

In der Messung ist die Kallikrein-Aktivität nach 25 min Inkubationszeit mit Aprotinin am stärksten gehemmt (Abb. 22). Zu diesem Zeitpunkt werden in der Küvette 3,4 mIU Inhibitor nachgewiesen gegenüber 3,3 mIU nach 15 Minuten Inkubationszeit.

Für die Molaritätsbestimmung des Schweine-Pankreas-Kallikreins wird jedoch an der Inkubationszeit von 15 Minuten festgehalten, weil nach Fritz et al. (15) bei längeren Inkubationszeiten der wahre Inhibitorspiegel durch enzymatische Aktivierungs- und Inaktivierungsvorgänge verfälscht sein kann.

4. Spaltung von Inter-α-Trypsin-Inhibitor durch Schweine-Pankreas-Kallikrein

2,3 nMol Schweine-Pankreas-Kallikrein werden mit 1,8 nMol ITI (= 108 mIU Hemmaktivität gegenüber Trypsin) bei pH 9 und 25°C in einem Gesamtvolumen von 660 µl inkubiert.

Das molare Verhältnis Enzym : Inhibitor beträgt 1,3.

Entsprechend Kap. B.I.5 wird zu verschiedenen Zeiten nach Reaktionsbeginn der entstandene säurestabile Inhibitor abgetrennt.

Schließlich wird zur Hemmung von Trypsin im BAPA-Test jene Menge neutralisierten Überstands eingesetzt, die 4,9 mIU ITI (Hemmaktivität gegenüber Trypsin) entspricht.

Innerhalb von 60 Minuten werden unter den angegebenen Reaktionsbedingungen nur 0,31 mIU säurestabiler Inhibitor von theoretisch möglichen 4,9 mIU freigesetzt.

Verschiedene Gründe sind denkbar, warum sich nach 60 Minuten Inkubation mit Kallikrein nur so wenig gespaltener Inhibitor nachweisen läßt:

- Der Inhibitor kann bei dem unphysiologischen pH-Wert im Inkubationsgemisch (pH 9) zerstört worden sein. Dagegen spricht, daß sich der im Inkubat eingesetzte Inhibitor ohne Säurefällung durch Hemmung von Trypsin im BAPA-Test vollständig nachweisen läßt.

- Die Möglichkeit, daß das Kallikrein im Inkubationsgemisch seine Aktivität verloren hat, ist ausgeschlossen, weil man selbst einen Tag nach Beginn der Inkubation mit ITI noch die gesamte eingesetzte Aktivität findet.

- Um zu klären, ob der unphysiologische pH-Wert möglicherweise die Spaltung des ITI verhindert hat (Abweichung vom pH-Optimum ?), wird die Spaltung nochmals bei pH 7,4 wiederholt. Nach Isolierung wird der jeweils bis zu diesem Zeitpunkt freigesetzte säurestabile Inhibitor als Hemmaktivität gegenüber Trypsin im BAPA-Test nachgewiesen. Die gemessenen Trypsinaktivitäten sind in Abb. 23 wiedergegeben.

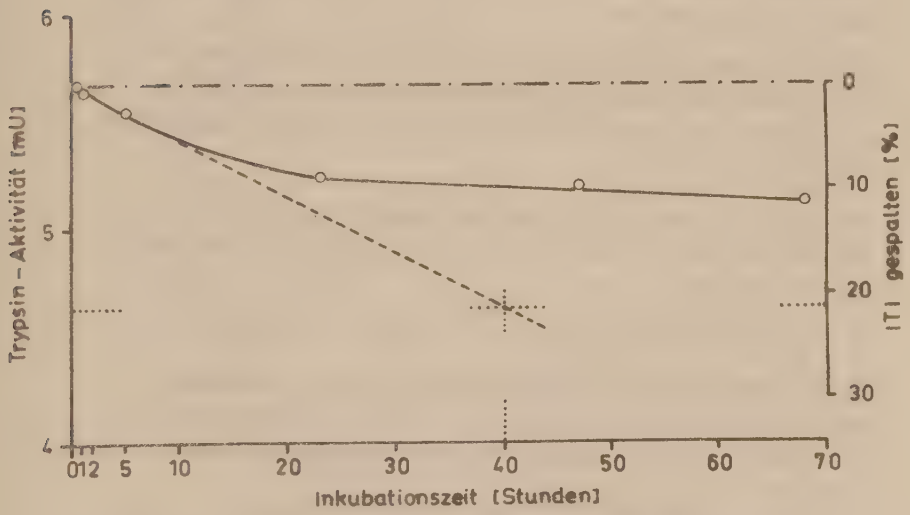


Abb. 23: Versuch der Spaltung von 1,8 nMol ITI durch 2,3 nMol Schweine-Pankreas-Kallikrein bei pH 7,4. Bestimmung des entstehenden säurestabilen Inhibitors durch Trypsin-Hemmung im BAPA-Test.

Auch bei pH 7,4 werden innerhalb von 68 Stunden allenfalls 0,65 mIU von theoretisch erreichbaren 4,9 mIU gespaltenen Inhibitors freigesetzt, obgleich sich nach 68 Stunden noch die gesamte eingesetzte Kallikrein-Aktivität im Inkubat nachweisen läßt.

Im Verlauf der weiter unten beschriebenen Messungen (Kap. B.IV.12) zeigte sich, daß das ITI-Präparat eine proteolytische Verunreinigung enthält. An dieser Stelle konnte noch nicht ausgeschlossen werden, daß die geringe nachgewiesene Menge säurestabilen Inhibitors möglicherweise durch diese Verunreinigung aus ITI freigesetzt wird und nicht durch Kallikrein.

Die Angabe einer genauen Spaltgeschwindigkeit ist unter solchen Umständen natürlich nicht möglich. Es soll aber wenigstens ein Maximalwert für die Spaltgeschwindigkeit berechnet werden, um Vergleiche mit den anderen Enzymen anstellen zu können:

In 40 Stunden werden - bei linearer Extrapolation der Anfangsgeschwindigkeit - höchstens (5,66 - 4,62) mIU = = 1,04 mIU von theoretisch möglichen 4,9 mIU freigesetzt. Das sind 21 %.

Von den 1,8 nMol ITI im Inkubat werden also $\leq$ 21 % $\hat{=}$ $\hat{=}$ 0,38 nMol in 40 Stunden gespalten. Die Spaltgeschwindigkeit beträgt also

$$\leq \frac{0{,}38 \text{ nMol}}{6{,}6 \cdot 10^{-4} \text{ l} \cdot 40 \text{ Std.}} = 0{,}24 \text{ nMol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}.$$

Unter gleichen Versuchsbedingungen spaltet Schweine-Pankreas-Kallikrein den nativen ITI also höchstens mit 0,6 % der Geschwindigkeit von Schweine- oder Human-Plasmin.

5. Empfindlichkeit von Schweine-Pankreas-Kallikrein gegenüber Perchlorsäure

Um die Möglichkeit zu prüfen, daß das zur ITI-Spaltung eingesetzte Kallikrein bei der Säurefällung nicht ganz denaturiert wird und der nach Neutralisation erhalten gebliebene Rest eine erhöhte Trypsin-Aktivität im BAPA-Test vortäuscht, wird die Aktivität von Kallikrein nach verschieden langer Einwirkung von 6 %-iger Perchlorsäure bei 25°C gemessen.

Ohne Säurefällung hat das pro Testküvette eingesetzte Kallikrein eine Aktivität von 9 mU gegenüber dem KABI-Substrat S - 2266.

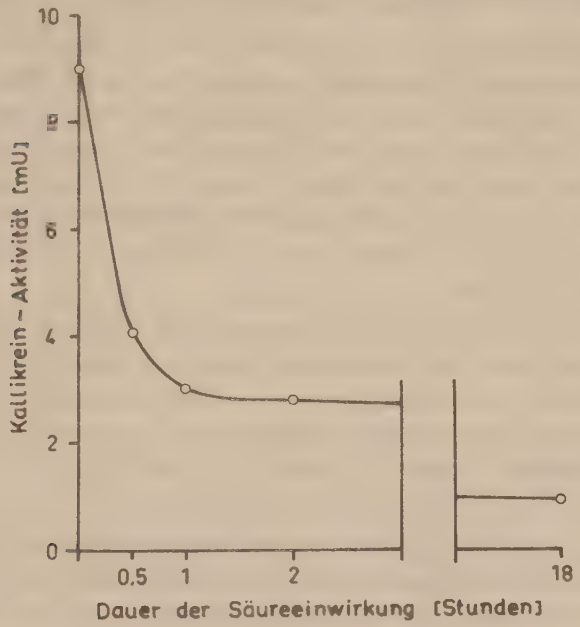


Abb. 24: Inaktivierung von Schweine-Pankreas-Kallikrein nach verschieden langer Inkubation mit 6 %-iger Perchlorsäure bei 25°C

Nach 30 Minuten Säurefällung in 6 %-iger Perchlorsäure bei 25°C sind noch 45 % des eingesetzten Kallikreins erhalten. Auch eine 18-stündige Säurefällung bei 25°C vermag nur 90 % des Kallikreins zu zerstören.

Nach diesem überraschenden Ergebnis ist wichtig zu wissen, ob und wie schnell das nach der Säurefällung erhalten gebliebene Kallikrein BAPA spaltet.

6. Einfluß von Kallikrein auf die BAPA-Spaltung

Der BAPA-Test wird in der sonst für die Trypsin-Aktivitätsmessung üblichen Zusammensetzung, jedoch mit Kallikrein als Enzym durchgeführt.

100 µg Kallikrein ergeben dann eine Aktivität von 1,77 mU.

Nach der ITI-Spaltung mit Kallikrein war in den BAPA-Test ein Überstand eingesetzt worden, der neben dem Hemmstoff 3,3 µg Kallikrein enthalten hatte (vor Säurefällung), von denen nach Säurefällung noch etwa 50 %, also 1,65 µg erhalten geblieben waren. Sie hatten eine Aktivität von 0,03 mU, die gegenüber den theoretisch erreichbaren 4,9 mIU gespaltenen Inhibitors sicher nicht ins Gewicht fielen.

Damit ist die Möglichkeit ausgeschlossen, daß die nach Säurefällung erhalten gebliebene Kallikrein-Aktivität im BAPA-Test eine Verminderung des durch Kallikrein freigesetzten säurestabilen Inhibitors vortäuscht. Bei Einsatz größerer Mengen Kallikrein im BAPA-Test ist jedoch Vorsicht geboten.

Nachdem die Inkubation von ITI mit der 1,3-fachen molaren Kallikrein-Konzentration eine solch geringe Ausbeute an säurestabilem Inhibitor erbracht hat, stellt sich die Frage, ob dieses Enzym überhaupt ITI spalten kann. Dies kann durch den Versuch einer Spaltung von ITI bei höherer Kallikrein-Konzentration geprüft werden.

Dazu muß jedoch das Verfahren der Säurefällung derart abgewandelt werden, daß das eingesetzte Kallikrein in der Säure ganz zerstört wird und der entstandene säurestabile Inhibitor die Säurefällung trotzdem übersteht.

7. Empfindlichkeit trypsinolytisch entstandenen säurestabilen Inhibitors gegenüber warmer Perchlorsäure

Nach der in Kap. B.I.8 angegebenen Vorschrift wird durch Trypsinolyse säurestabiler Inhibitor hergestellt. Die einzige Veränderung besteht darin, daß die Abtrennung in 6 %-iger Perchlorsäure auch bei anderen Temperaturen als 25°C erfolgt. Der freigesetzte säurestabile Inhibitor wird durch Hemmung von Trypsin im BAPA-Test nachgewiesen (Abb. 25).

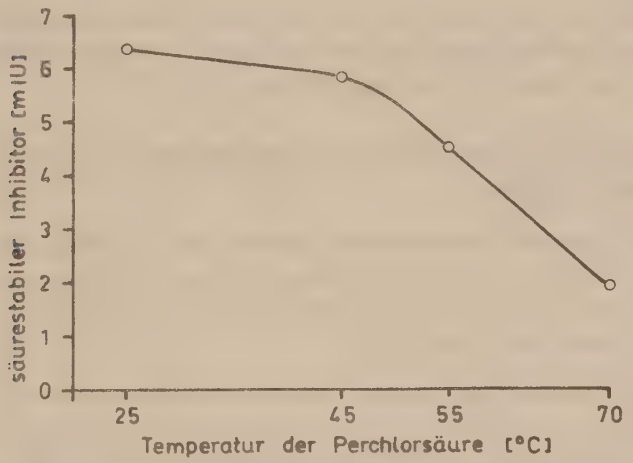


Abb. 25: Erhalten gebliebene Hemmaktivität nach 30-minütiger Inkubation von säurestabilem Inhibitor mit 6 %-iger Perchlorsäure bei verschiedenen Temperaturen

Nach 30 Minuten Säurefällung in 45°C warmer Perchlorsäure sind noch mehr als 90 % der säurestabilen Inhibitormenge nachweisbar, die sich nach Säurefällung bei 25°C gewin-

nen ließe. Bei höheren Temperaturen wird der Inhibitor zunehmend zerstört. Die Abtrennung des säurestabilen Inhibitors in 6 %-iger Perchlorsäure kann also höchstens bei 45°C erfolgen.

8. Denaturierung von Schweine-Pankreas-Kallikrein in 45°C warmer Perchlorsäure

Schweine-Pankreas-Kallikrein wird 30 Minuten lang mit 6 %-iger Perchlorsäure bei 45°C inkubiert. Nach Zentrifugation und Neutralisation wird die verbliebene Kallikrein-Aktivität durch Spaltung des KABI-Substrats S-2266 gemessen.

Von eingesetzten 32 mU (vor Säurefällung) weist man noch 0,06 mU nach (nach Säurefällung).

Das bedeutet, daß während 30-minütiger Säurefällung in 6 %-iger Perchlorsäure bei 45°C mehr als 99 % des eingesetzten Kallikreins zerstört werden.

9. Spaltung von ITI durch hohen Überschuß von Schweine-Pankreas-Kallikrein

47 nMol Schweine-Pankreas-Kallikrein und 1,8 nMol ITI werden bei 25°C und pH 9 in einem Gesamtvolumen von 660 µl inkubiert. Enzym und ITI stehen hier in einem molaren Verhältnis von 26.

Zu verschiedenen Zeiten nach Reaktionsbeginn wird die Spaltung durch Zugabe zu 45°C warmer Perchlorsäure beendet, danach der entstandene säurestabile Inhibitor in gewohnter Weise abgetrennt und durch Hemmung von Trypsin im BAPA-Test nachgewiesen.

Der pro Testküvette eingesetzte Überstand würde ohne Säurefällung 4,9 mIU Hemmaktivität enthalten.

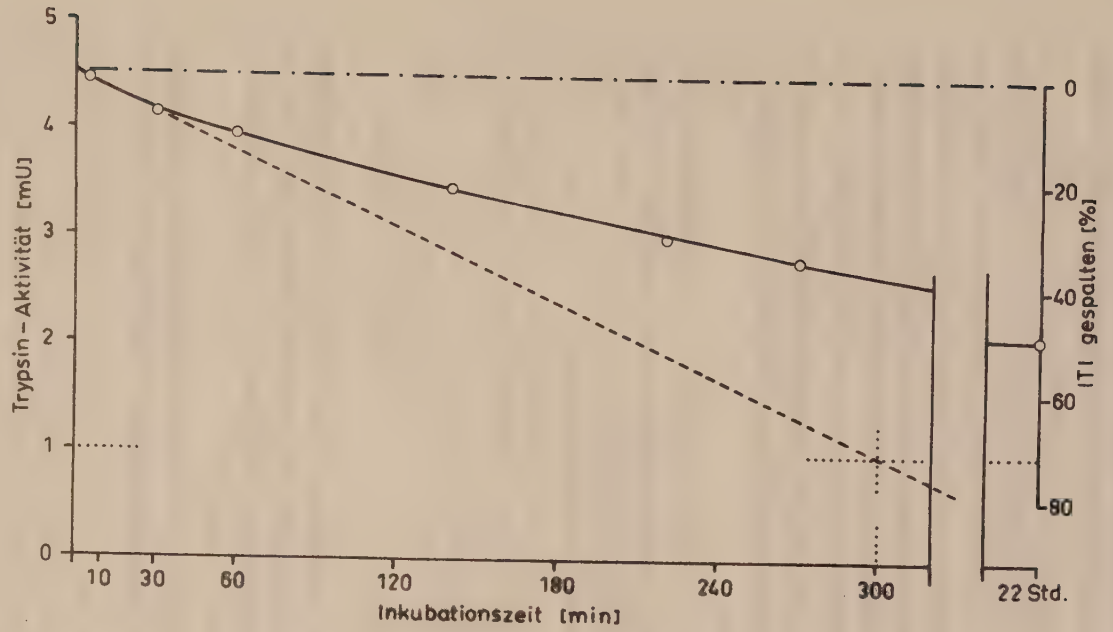


Abb. 26: Spaltung von ITI (2,7 µMol/l) mittels Schweine-Pankreas-Kallikrein (26-fache molare Menge).
Bestimmung des entstehenden säurestabilen Inhibitors durch Hemmung von Trypsin im BAPA-Test.

Nach 22 Stunden Inkubation mit Schweine-Pankreas-Kallikrein in 26-facher molarer Menge sind (4,45 - 2,10) mIU = = 2,35 mIU säurestabiler Inhibitor mehr pro Küvette nachweisbar als bei Reaktionsbeginn. Das sind 48 % von den maximal erreichbaren 4,9 mIU.

Die Kallikrein-Aktivität im Inkubat ist 20 Stunden nach Beginn der Spaltung noch gleich hoch wie am Anfang, was sich durch Einsatz einer kleinen Menge Inkubat in den KABI-Test (Kap. B.IV.1) leicht verifizieren läßt.

Zur Abschätzung der Geschwindigkeit der ITI-Spaltung ermittelt man die Steigung der Tangente am Anfangsteil der Spaltkurve.

In 300 Minuten (5 Stunden) werden - linear extrapoliert - (4,5 - 1,0) mIU = 3,5 mIU gespaltener Inhibitor von den maximal möglichen 4,9 mIU nachgewiesen. Das sind 71 %.

Im Inkubat werden also mindestens 0,71 · 1,8 nMol ITI = = 1,29 nMol ITI innerhalb von 300 Minuten gespalten. Die Spaltgeschwindigkeit beläuft sich also auf etwa

$$\frac{1{,}29 \cdot 10^{-9}}{6{,}6 \cdot 10^{-4} \cdot 300} \frac{\text{Mol}}{\text{l} \cdot \text{min}} = 6{,}5 \text{ nMol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}.$$

Zusammenfassung:

Inkubiert man 2,7 µMol/l ITI mit der 1,3-fachen molaren Konzentration Schweine-Pankreas-Kallikrein bei 25°C, so werden pro Minute $2{,}4 \cdot 10^{-10}$ Mol · l^{-1} · min^{-1} säurestabiler Inhibitor freigesetzt.

Bei Inkubation mit der 26-fachen Enzymkonzentration beträgt die Spaltgeschwindigkeit 6,5 nMol · l^{-1} · min^{-1}.

10. Hemmung von Schweine-Pankreas-Kallikrein durch trypsinolytisch entstandenen säurestabilen Inhibitor

Auf die gleiche Weise wie in Kap. B.I.8 wird trypsinolytisch säurestabiler Inhibitor hergestellt. Der Überstand nach Neutralisation enthält 257 mIU/ml säurestabilen Inhibitor. Zur Hemmung von 49 pMol Kallikrein werden 850 pMol trypsinolytisch freigesetzter Inhibitor 15 Minuten lang mit dem Enzym inkubiert. Danach wird die Kallikrein-Aktivitäten mit dem KABI-Substrat S-2266 gemessen. Als Bezugswert wird die Kallikrein-Aktivität in Anwesenheit inhibitorfreier Fällungsreagentien gemessen.

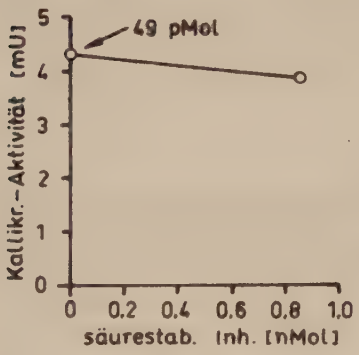


Abb. 27:
Hemmung von 49 pMol Schweine-Pankreas-Kallikrein durch 850 pMol trypsinolytisch entstandenen säurestab. Inhibitor

49 pMol Schweine-Pankreas-Kallikrein werden durch 850 pMol trypsinolytisch freigesetzten Inhibitor (17 - fache molare Menge) höchstens um 10 % gehemmt.

11. Hemmung von Schweine-Pankreas-Kallikrein durch kallikrein-gespaltenen säurestabilen Inhibitor

Ein Rest des Inkubats aus Kap. B.IV.9 (Spaltung mit 26-facher Kallikrein-Menge) wird 24 Stunden nach Beginn der Spaltung einer 30 - minütigen Säurefällung bei 45°C unterworfen. Zu diesem Zeitpunkt sind mindestens 55 % des Inhibitors gespalten (Abb. 26).

Der Überstand nach Neutralisation enthält dann $0{,}55 \cdot 2{,}7 \cdot 10^{-10}$ Mol/ml = 0,15 nMol/ml Inhibitor.

Zur Hemmung von 49 pMol Kallikrein werden 45 pMol Inhibitor bei 25°C 15 Minuten lang mit dem Enzym inkubiert. Anschließend wird die verbliebene Kallikrein-Aktivität mit dem KABI-Substrat S-2266 gemessen. Dabei stellt man keinerlei Hemmung der Kallikrein-Aktivität fest.

12. Beeinflussung der Schweine-Pankreas-Kallikrein-Aktivität durch nativen ITI

Zur "Hemmung" von 62 pMol Kallikrein wird ITI-Stammlösung (89 nMol/ml) eingesetzt. Nach 15 Minuten Inkubation wird die Kallikrein-Aktivität gegenüber dem Substrat S-2266 gemessen.

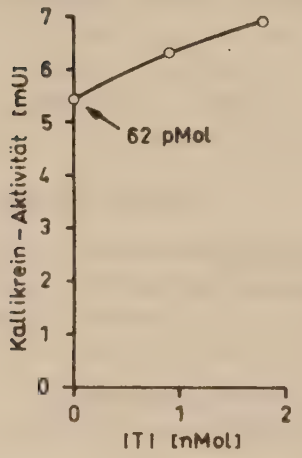


Abb. 28:
Einfluß von nativem ITI auf die Aktivität von Schweine-Pankreas-Kallikrein gegenüber dem Substrat S-2266

Durch 1,8 nMol ITI, also 30-fachen molaren Inhibitorüberschuß, wird die Kallikrein-Aktivität nicht gehemmt. Im Gegenteil: Das Kallikrein-Substrat S-2266 wird sogar noch schneller gespalten!

V. Die proteolytische Verunreinigung in der ITI-Stammlösung

1. Nachweis einer proteolytischen Verunreinigung in der ITI-Stammlösung

Nach dem überraschenden Ergebnis von Kap. B.IV.12 (scheinbare Steigerung der Kallikrein-Aktivität nach Inkubation mit ITI-Stammlösung) wird versuchsweise das KABI-Substrat S-2266 nur mit 10 µl ITI-Stammlösung ($\hat{=}$ 0,89 nMol ITI) und Puffer gemischt. Auch ohne Kallikrein wird das Substrat mit der Aktivität 0,28 mU pro Milliliter Küvetteninhalt gespalten. Bei Messung des Substratleerwerts (nur Puffer und Substrat in der Meßküvette) beobachtet man jedoch keine Substratspaltung.

Folglich muß die ITI-Stammlösung eine proteolytische Aktivität enthalten, die das KABI - Substrat spaltet.

2. Spaltung verschiedener Substrate mit der ITI-Stammlösung

Zur näheren Charakterisierung der proteolytischen Verunreinigung in der ITI-Stammlösung wird versucht, die KABI-Substrate S-2266 (für Drüsen-Kallikrein), S-2251 (für Human-Plasmin) und S-2302 (für Serum-Kallikrein) mit ITI-Stammlösung zu spalten. Die Substratkonzentrationen und Reaktionsbedingungen (Puffer, pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur) werden entsprechend den Empfehlungen in den Firmenprospekten des Substratherstellers gewählt.

Mit den einzelnen Substraten mißt man pro Milliliter ITI-Stammlösung folgende Enzym-Aktivitäten:

S - 2266 : 30 mU S - 2251 : 50 mU S - 2302 : 10 mU

Das Substrat S-2251 für Human-Plasmin wird durch die proteolytische Verunreinigung im ITI-Präparat am schnellsten gespalten.

3. Empfindlichkeit der proteolytischen Verunreinigung gegenüber Perchlorsäure

Trypsinolytisch freigesetzter Inhibitor (Herstellung und Abtrennung wie in Kap. B.I.8) wird in einer Menge, die aus etwa 10 µl ITI-Stammlösung entsteht, wie in Kap. B.V.2 als "Enzym" zur Spaltung des Substrats S - 2266 eingesetzt. Es ist jedoch keine amidolytische Aktivität mehr nachweisbar.

10 µl ITI-Stammlösung hätten gegenüber S - 2266 ohne vorausgegangene Säurefällung eine Aktivität von etwa 0,3 mU gehabt.

Die proteolytische Verunreinigung im ITI-Präparat wird also in 6 %-iger Perchlorsäure zerstört.

4. Hemmbarkeit der enzymatischen Aktivität durch verschiedene Protein-Proteinase-Inhibitoren

Zur weiteren Charakterisierung wird die Hemmbarkeit des fremden Enzyms mit verschiedenen Proteinase-Inhibitoren untersucht.

10 µl ITI-Stammlösung (0,89 nMol ITI) werden mit Aprotinin, Soja-Bohnen-Inhibitor (Kunitz-Typ) und Lima-Bohnen-Inhibitor inkubiert. Bei der anschließenden Aktivitätsmessung mit dem KABI-Substrat S - 2266 beobachtet man folgendes Hemmverhalten:

Inhibitor	Menge	Inkubationszeit	Hemmung
Aprotinin	0,45 nMol	15 min	keine
Soja-Bohnen-Inh.	10 nMol	15 min	keine
Soja-Bohnen-Inh.	10 nMol	24 Std	20 % H.
Lima-Bohnen-Inh.	20 nMol	24 Std	10 % H.

Die unbekannte enzymatische Aktivität ist, falls überhaupt, erst nach sehr langer Inkubationszeit geringfügig hemmbar.

5. Hemmbarkeit der enzymatischen Aktivität durch NPGB

20 µl ITI-Stammlösung (1,8 nMol ITI) werden mit 25 nMol NPGB inkubiert.

Die Spaltung des NPGB läuft in Anwesenheit der ITI-Stammlösung um 20 % schneller ab als die Eigenspaltung vor Zugabe der ITI-Stammlösung (Abb. 29).

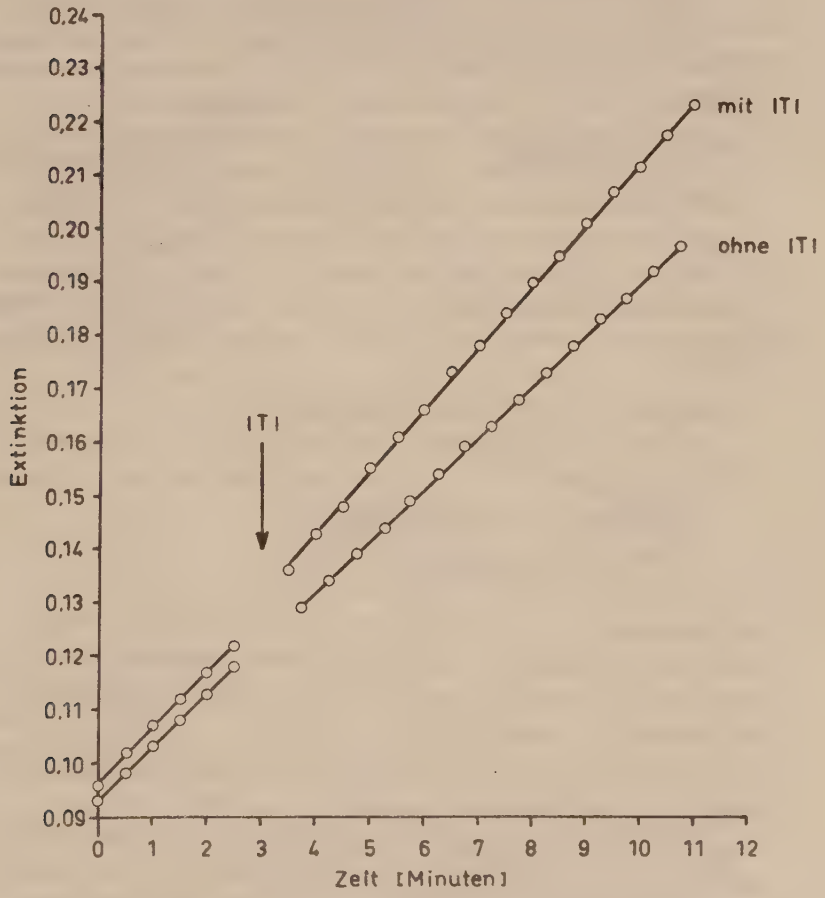


Abb. 29: Spaltung von NPGB in Anwesenheit von ITI-Stammlösung ("mit ITI") im Vergleich zur Eigenspaltung ("ohne ITI").

Das ist ein Hinweis darauf, daß NPGB mit der proteolytischen Verunreinigung reagiert. Die erhöhte Spaltgeschwindigkeit wird auch noch 7,5 Minuten nach Zugabe des ITI-Präparats beobachtet, was zeigt, daß die Reaktion zwischen der enzymatischen Verunreinigung und NPGB nicht irreversibel abläuft.

18 Stunden nach Inkubationsbeginn wird die enzymatische Aktivität in der Probe durch Zugabe von S - 2266 bestimmt.

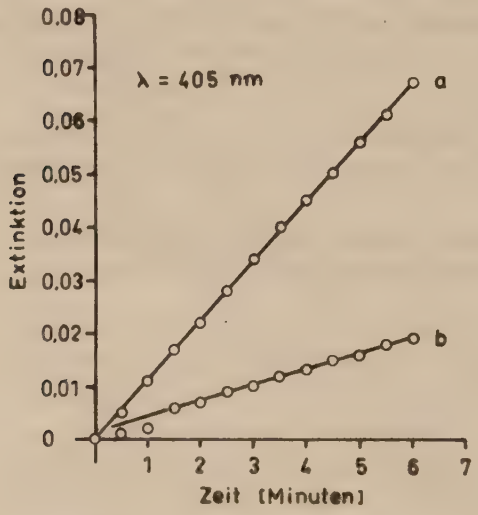


Abb. 30:

a) Spaltung von S-2266 durch die enzymatische Verunreinigung in der ITI-Stammlösung

b) Restaktivität nach 18-stündiger Inkubation der ITI-Stammlösung mit NPGB

Die gemessene Aktivität ist um 70 % niedriger als bei einer Vergleichsprobe, in der die gleiche Menge ITI-Stammlösung, jedoch ohne NPGB unter gleichen Bedingungen inkubiert worden ist.

NPGB wird von der proteolytischen Verunreinigung wahrscheinlich als Substrat umgesetzt. Es erfolgt keine irreversible Blockierung wie bei Trypsin. Die Aktivitätserniedrigung um 70 % wird möglicherweise durch frei gewordenes p-Guanidinobenzoat bewirkt.

C. DISKUSSION

1) Das in Kap. B.I.5 angegebene Verfahren der Säurefällung gestattet es, säurestabilen Inhibitor von nativem ITI vollständig zu trennen und den gesamten freigesetzten Inhibitor durch Hemmung von Trypsin nachzuweisen.

Die genaue Übereinstimmung zwischen der molaren Menge nach hinreichend langer Inkubation mit Trypsin nachgewiesenen säurestabilen Inhibitors und der eingesetzten ITI-Menge zeigt, daß aus jedem Molekül ITI durch proteolytische Spaltung genau ein Molekül säurestabiler Inhibitor freigesetzt wird. Erst durch die schonende Säurefällung und Neutralisation, wie sie hier ausgearbeitet und erprobt wurde, zeigte sich, daß der ITI durch tryptische Spaltung zu 100 % in säurestabilen Inhibitor umgesetzt wird und nicht nur zu 50 %, wie vorher gefunden worden war (Hochstrasser, unveröffentlichte Untersuchungen).

2) Die Geschwindigkeiten der ITI-Spaltung bei Inkubation von 2,7 µMol/l ITI mit der 1,3 - fachen molaren Enzym-Konzentration ergeben sich zu:

	gemessene Spaltgeschw. $\left[\text{Mol} \cdot l^{-1} \cdot \text{min}^{-1}\right]$	relative Spaltgeschw. $\left[v_{\text{H.-Plasmin}} = 1\right]$
Rinder-Trypsin	$5{,}0 \cdot 10^{-7}$	12
Schweine-Plasmin	$3{,}9 \cdot 10^{-8}$	0,97
Human-Plasmin	$4{,}0 \cdot 10^{-8}$	1,0
Schweine-Pankreas-Kallikrein	$2{,}4 \cdot 10^{-10}$	0,006

3) Schweine-Pankreas-Kallikrein vermag, aus ITI säurestabilen Inhibitor freizusetzen, wie sich aus der Erhöhung der Spaltgeschwindigkeit bei Inkubation mit Schweine-Pankreas-Kallikrein in höherer Konzentration schließen läßt. Aber auch durch die 26 - facne Enzym-Konzentration

(gegenüber ITI) werden 2,7 µMol/l ITI nur mit der Geschwindigkeit von etwa $6{,}5 \cdot 10^{-9}$ Mol·l^{-1}·min^{-1} gespalten, also erst mit ca. 16 % der Geschwindigkeit, die durch Human-Plasmin bereits in 1,3 - fachem Überschuß erreicht wird. Die Zunahme der Spaltgeschwindigkeit bei höherer Kallikrein-Konzentration beweist jedoch, daß tatsächlich das Kallikrein den ITI spaltet und nicht etwa die enzymatische Verunreinigung im ITI-Präparat.

4) Weder mit nativem ITI noch mit den säurestabilen Inhibitoren, die bei Spaltung von ITI durch Trypsin oder Kallikrein freigesetzt werden, kann eine signifikante Hemmung der Kallikrein-Aktivität beobachtet werden.

5) Schweine- und Human-Plasmin spalten ITI annähernd mit gleicher Geschwindigkeit, die bei 1/12 der Spaltgeschwindigkeit des Standard-Enzyms Trypsin liegt und somit relativ hoch ist.

6) Während Schweine-Plasmin durch äquimolare Mengen des nativen ITI oder seiner Spaltprodukte noch deutlich gehemmt wird (Hemmung um 30 bis 50 %), kann man bei Human-Plasmin nur sehr schwache Hemmung beobachten.

Erst etwa 50 - facher molarer Überschuß an trypsinolytisch freigesetztem Inhibitor hemmt Human-Plasmin um 50 %. Mit nativem ITI und dem durch Human-Plasmin freigesetzten Spaltprodukt ist die Hemmung noch weit geringer.

Trypsinolytisch freigesetzter Inhibitor enthält neben I-34 auch I-17 und I-10, die säurestabilen Inhibitoren mit den niedrigsten Molekulargewichten unter den bekannten ITI-Spaltprodukten (Molekulargewichte von 17 000 bzw. 10 000). Man kann sie als Endprodukte einer Folge enzymatischer Spaltungen des ITI-Moleküls ansehen. Die etwas stärkere Hemmung von Human-Plasmin durch trypsinolytisch entstandenen Inhibitor läßt an eine Endprodukt-Hemmung denken, wie sie in der Biochemie oft beobachtet wird.

7) Auf Grund der gemessenen Spaltgeschwindigkeiten im in vitro - Test kommt Plasmin eher als Kallikrein als dasjenige Enzym in Frage, welches aus ITI säurestabilen Inhibitor abspaltet. Wie sieht es aber in vivo aus ?

ITI kommt im Plasma in einer Konzentration von 200 bis 700 mg/l vor (21). Bei einem Molekulargewicht von etwa 200 000 ist seine Konzentration dann 1,0 - 3,5 µM (im Test 2,7 µM).

Die Konzentration von Plasminogen im Plasma beträgt 300 mg/l[2]. Bei einem Molekulargewicht von 81 000 ergibt sich die molare Konzentration zu 3,7 µM. Die normale fibrinolytische Aktivität, d. h. der Anteil zu Plasmin aktivierten Plasminogens ist relativ gering und unterliegt rhythmischen Schwankungen (21). Unter Streß verschiedener Ursachen (Muskelarbeit, chirurgische Eingriffe, Infekte) kommt es jedoch zur Steigerung der fibrinolytischen Aktivität. Wenn in einem solchen Fall - zumindest lokal - das gesamte Plasminogen zu Plasmin aktiviert ist, liegt die Plasmin-Konzentration mit 3,7 µM in der gleichen Größenordnung wie die ITI-Konzentration, somit auch in der gleichen Größenordnung wie in unserem in vitro - Test. Im beschriebenen Test (Kap. B.III.5) wurde ITI durch Human-Plasmin mit deutlich meßbarer Geschwindigkeit gespalten.

Da Human-Plasmin durch ITI und durch die säurestabilen Bruchstücke kaum gehemmt wird, reicht auch schon eine niedrigere Plasmin-Konzentration aus, um ITI zu spalten. Die Freisetzung säurestabiler Inhibitoren dauert dann natürlich länger. Aber auch die entzündliche Reaktion braucht zu ihrer vollen Ausbildung mit Einwanderung von Granulozyten und Freisetzung lysosomaler Enzyme in der

---

2) Behringwerke, Frankfurt/Main:
Tabelle der Proteine des menschlichen Blutplasmas.

Regel Stunden. Auch dann, wenn nur ein Teil des Plasminogens zu Plasmin aktiviert ist, können die plasminolytisch freigesetzten Inhibitoren also noch rechtzeitig ihre mutmaßliche Aufgabe erfüllen, nämlich die Hemmung lysosomaler Enzyme.

Als Bildungsorte des Plasminogens werden neben der Leber auch die Nieren angenommen. Die säurestabilen Inhibitoren als Endprodukte der proteolytischen Spaltung von ITI können durch die Nieren ausgeschieden werden, um im Nierenparenchym und in den ableitenden Harnwegen leukozytäre Proteinasen zu hemmen. Es ist möglich, daß dieser topographische Zusammenhang nicht zufällig ist.

Neben seiner Hauptfunktion, die Blockierung des zirkulatorischen Systems durch Thromben zu verhindern, hat Plasmin auch die Aufgabe, durch Abbau des an verletzten Stellen abgelagerten Fibrins die Reparatur von Gewebedefekten durch zelluläre Elemente einzuleiten. Die dann einwandernden Makrophagen enthalten wiederum Proteinasen, gegen welche die noch erhaltenen Basalmembranen geschützt werden müssen. Die säurestabilen Spaltprodukte können diese Schutzfunktion wegen ihrer besseren Diffusion möglicherweise eher wahrnehmen als nativer ITI.

8) Der Nachweis der Spaltung von ITI durch Plasmin berechtigt natürlich noch nicht dazu, dieses Enzym nun als d a s physiologischerweise spaltende Enzym anzusehen. Der bei erstmals beobachteter ITI-Spaltung durch Schweine-Pankreas-Kallikrein (5) geäußerte Optimismus, in den Kallikreinen schon den Schlüssel zur ITI-Spaltung zu haben, muß zwar im Licht der vorliegenden Meßergebnisse als verfrüht erscheinen. Andererseits berechtigt die gemessene, zwar langsame, aber doch nachweisbare Spaltung mit Schweine-Pankreas-Kallikrein nicht dazu, die Kallikreine nun kurzerhand aus der Diskussion um das

physiologisch spaltende Enzym auszuscheiden. Erstens lassen sich die Messungen mit tierischem Enzym nicht ohne weiteres auf menschliches Enzym übertragen. Zweitens bestehen zwischen den Drüsen-Kallikreinen und dem Plasma-Kallikrein beträchtliche Unterschiede. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Messungen lagen jedoch menschliche Kallikreine noch nicht in reiner Form vor.

Neben Plasma- und Harn-Kallikrein müssen noch weitere menschliche Proteinasen untersucht werden, sobald sie isoliert sind: Hagemann-Faktor (Faktor XII des Blutgerinnungs-Systems) sowie granulozytäre Enzyme, wie Elastase und Kathepsin.

Schließlich muß noch festgestellt werden, welche bakteriellen und leukozytären Enzyme durch die säurestabilen Bruchstücke des ITI wirklich gehemmt werden.

D. EXPERIMENTELLE DETAILS

Geräte und Substanzen

1) Geräte:

_Eppendorf Enzym-Meßplatz
Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg.

2) Enzyme:

_Kristallinisches Trypsin (Rind), Novo Industri A/S, gefriergetrocknet, stabilisiert, 4130 NF units/mg, MG = 24 000, Batch 63.

_Schweine-Plasmin Pyrogenrenset, Novo Industri A/S 3,20 NE/mg, Batch 75-19.

_Test-Plasminogen, human, Behringwerke, Frankfurt/Main, Spez. Aktivität = 30 CTA - Einheiten pro Flasche, in Puffer (pH 7,4) aus 0,05 M Tris, 0,0125 M NaCl und 0,01 M Lys, mit Ficoll als Stabilisator lyophilisiert.

_Streptokinase, Behringwerke,
Inhalt eines Fläschchens: 5 000 IE.

_Schweine-Pankreas-Kallikrein, Bayer, Leverkusen, Aktivität 1180 KE/mg.

3) Inhibitoren:

_Aprotinin (Trasylol^{R}), Bayer, Leverkusen.

_Inter-α-Trypsin-Inhibitor, 2,2 % in 0,85 % NaCl, MG 180 000, 22 mg/ml = 5140 mIU/ml = 234 mIU/mg, Geschenk von Prof. Hochstrasser.

_Soja-Bohnen-Trypsin-Inhibitor (Kunitz-Typ), Merck.

_Lima-Bohnen-Inhibitor, E. Merck, Darmstadt.

_NPGB, Bayer, Leverkusen.

4) Substrate:

- L-BAPA (N-α-Benzoyl-L-arginin-4-nitoanilid), E. Merck, Darmstadt.
- Substrat S - 2251 (H-D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilid · 2 HCl), MG 551,5, KABI-Werke, Mölndal (Schweden).
- Substrat S - 2266 (H-D-Val-Leu-Arg-pNA · 2 HCl), MG 579,6, KABI-Werke, Mölndal (Schweden).
- Substrat S - 2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA · 2 HCl), MG 611,6, $K_M = 2 \cdot 10^{-4}$ M, KABI-Werke, Mölndal (Schweden).

I. Messungen mit Rinder-Trypsin

1. Der BAPA-Test

Messung der Trypsin-Aktivität und der Trypsin-Hemmung durch verschiedene Inhibitoren.

Enzym: Rinder-Trypsin wird in der Konzentration 4 mg/100 ml in aqua dest gelöst. Die Lösung wird mit einigen Tropfen HCl auf pH 3 gebracht.

Puffer: 0,2 M Triäthanolamin mit 0,02 M $CaCl_2$, pH 7,8 mit HCl eingestellt.

Substrat: L-BAPA (MG = 435), in der Konzentration 167 mg/ 100 ml in aqua dest gelöst.

(750 - x) µl TRA-Puffer, 50 µl Trypsin und x µl Inhibitor, 15 min bei 25°C inkubieren, dann 200 µl Substrat dazugeben, mischen und Extinktionszunahme pro min bei 405 nm messen.

2) Der NPGB-Test

Bestimmung der Molarität von Trypsin.

Enzym: Rinder-Trypsin, 8 mg/ml.

Puffer: 0,1 M Natriumveronal (Natriumdiäthylbarbiturat), pH 8,0 - 8,1 mit 0,02 M $CaCl_2$. Der pH-Wert wird vorsichtig eingestellt, weil bei pH 8 die freie Säure ausfällt.

Hemmstoff: 0,05 M p-NPGB (16,8 mg/ml), gelöst in Dimethylformamid, verdünnt mit 4 Volumenteilen Acetonitril. Die NPGB-Konzentration ist dann 0,01 M.

Pipettierschema:	Leerwert	Enzym-Ansatz
Veronal-Puffer	1000 µl	950 µl
Trypsin	-	50 µl
	Extinktion messen, danach	
NPGB	10 µl	10 µl
	Wiederholt in Abständen von 30 sec Extinktion messen.	

Das Mischen nach NPGB-Zugabe erfolgt durch mehrmaliges Umkippen der mit Parafilm verschlossenen Küvette.

3) Hemmung von Trypsin durch Aprotinin

Inhibitor: Aprotinin-Stammlösung 10 mg/ 100 ml in TRA-Puffer (Kap. D.I.1). Für diesen Test Verdünnung der Stammlösung mit TRA-Puffer auf das 10 - fache Volumen.
Enzym: Trypsin 4 mg/ 100 ml
Pipettierschema: Siehe Kap. D.I.1.

4) Hemmung von Trypsin durch nativen ITI

Inhibitor: ITI-Stammlösung (22 mg/ml in 0,85 % NaCl), mit TRA-Puffer auf das 50-fache Volumen verdünnt.
Alles weitere analog Kap. D.I.1

5) Spaltung von ITI durch Trypsin

43 µl Trypsinlösung (3,20 U/ml) werden mit
597 µl TRA-Puffer (aus Kap. D.I.1) bei 25°C vorinkubiert.
Start der Spaltungsreaktion durch Zugabe von
20 µl ITI-Stammlösung (≙ 1o8 mIU).
x min nach Reaktionsbeginn werden jeweils
50 µl des Reaktionsgemischs (≙ 8,1 mIU) zu
200 µl $HClO_4$ (7,5 %-ig) pipettiert.
30 min nach Säurezugabe wird das gefällte Protein abzentrifugiert, und
200 µl saurer Überstand werden mit
200 µl K_2CO_3 - Lösung neutralisiert.
Die Konzentration der K_2CO_3 - Lösung ist in Vorversuchen so eingestellt worden, daß sich nach Zugabe zu dem angesäuerten Inkubat pH 7,8 ergibt.
Nach Entweichen der entstehenden Kohlensäure wird der $KClO_4$ - Niederschlag abzentrifugiert.
Schließlich werden
200 µl Überstand (≙ 3,2 mIU) als Inhibitor in den BAPA-Test (Kap. D.I.1) eingesetzt.

6) Denaturierung von Trypsin in Perchlorsäure

Trypsinlösung (8 mg/ 100 ml) wird mit dem 4-fachen Volumen 7,5 %-iger $HClO_4$ gemischt und bei 25°C inkubiert.
Zu verschiedenen Zeiten nach Inkubationsbeginn werden Proben entnommen, zentrifugiert und weiter behandelt, wie in Kap. D.I.5 beschrieben.
Die nach Neutralisation im Überstand verbleibende Trypsin-Aktivität wird schließlich im BAPA-Test gemessen (D.I.1).
Zur Bestimmung der Trypsin-Aktivität in Gegenwart der Fällungsreagentien (t=0) werden
4 Volumenteile 7,5 %-ige Perchlorsäure mit
5 Volumenteilen K_2CO_3 - Lösung neutralisiert. Anschließend
1 Volumenteil Trypsinlösung (8 mg/ 100 ml) dazupipettieren.
Danach Zentrifugation und Messung der Trypsin-Aktivität im BAPA-Test.

7) Hemmgleichgewicht zwischen Trypsin und säurestabilem Inhibitor

Herstellung der säurestabilen Inhibitoren:
43 µl Trypsinlösung (7,5 mg/ml) (≙346 mU) und
60 µl K_2CO_3 - TRA - Gemisch (1+10) werden gemischt.
Nichtblutendes pH-Papier zeigt pH 7,8.
Start der Spaltungsreaktion durch Zugabe von
50 µl ITI-Stammlösung (≙ 269 mIU).
Nach 30-minütiger Spaltung Weiterbehandlung analog D.I.5.

Der so erhaltene Inhibitor wird in den BAPA-Test (D.I.1) eingesetzt. Dabei werden verschieden lange Inkubationszeiten gewählt.

II. Messungen mit Schweine-Plasmin

1) Der BAPA-Test

Enzym: Schweine-Plasmin 3,8 mg/ml in aqua dest.
Mit einem Tropfen HCl wird pH 3 eingestellt.
Puffer: 0,2 M Triäthanolamin mit 0,05 M Lysin.
pH 7,8 wird mit HCl eingestellt.
Substrat und Pipettierschema analog Kap. D.I.1.

2) Spaltung von ITI durch Schweine-Plasmin

200 µl Plasmin-Lösung (aus D.II.1) (≙ 2,3 nMol) werden mit
400 µl TRA-Puffer (aus D.II.1) bei 25°C vorinkubiert.
Start der Spaltungsreaktion durch Zugabe von
20 µl ITI-Stammlösung (≙ 1,8 nMol).
Nach x min werden jeweils 50 µl des Reaktionsgemischs
analog Kap. D.I.5 angesäuert und weiter behandelt.
Nach Neutralisation werden 300 µl Überstand (= 4,9 mIU)
in den BAPA-Test (D.I.1) eingesetzt.

3) Hemmung durch plasminolytisch gewonnenen Inhibitor

Herstellung des Inhibitors:
400 µl Schweine-Plasmin (3,8 mg/ml) (≙ 4,5 nMol),
10 µl K_2CO_3 - Lösung (aus Kap. D.I.5) und
30 µl TRA-Puffer (aus D.II.1) werden bei 25°C vorinkubiert.
Nichtblutendes pH-Papier zeigt pH 7,8.
Durch Zugabe von
50 µl ITI-Stammlösung (≙ 4,2 nMol ITI)
wird die Spaltung gestartet.
Nach 24 Stunden erfolgt Säurefällung analog Kap. D.I.5.
Nach Neutralisation sind im Überstand 2,6 nMol/ml.
Der so erhaltene Inhibitor wird in den BAPA-Test (D.II.1)
zur Hemmung von Schweine-Plasmin eingesetzt.

III. Messungen mit Human-Plasmin

1) Aktivierung mit Streptokinase

Streptokinase: 4,5 mg (≙ 538 IE) von insgesamt vorhandenen 41,8 mg (≙ 5000 IE) Streptokinase werden mit 250 µl aqua dest. aufgelöst.

Der Inhalt einer Flasche Test-Plasminogen, human (Behringwerke) wird mit 1,0 ml 25 %-igem Glyzerin aufgelöst, bei 37°C vorinkubiert und mit 107 IE Streptokinase (= 50 µl Streptokinaselösung) aktiviert. Nach 10 Minuten Aktivierungszeit bei 37°C wird die Lösung in Eiswasser auf 0°C abgekühlt. Die Lösung kann bei 4°C 5 Stunden ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

2) Messung der Aktivität von Human-Plasmin

Enzym: Plasmin-Stammlösung (aus Kap. D.III.1) wird mit 25 %-igem Glyzerin auf das 20-fache Volumen verdünnt.
Puffer: 0,05 M Tris (Trishydroxymethyl-aminomethan), gelöst in 0,108 M Kochsalzlösung (ergibt Ionenstärke I = 0,15). Mit HCl wird pH 7,4 eingestellt.
Substrat: S-2251 2,0 mg/ml in aqua dest. gelöst (MG=551,5).

Pipettierschema:
(850 - x) µl Tris-Puffer,
50 µl Plasmin-Verdünnung 1:20 und
x µl Inhibitor
15 Minuten lang bei 25°C inkubieren. Dann
100 µl Substrat dazugeben und Extinktionszunahme pro Minute bei 405 nm messen.

Die Adsorption von Human-Plasmin an der Küvettenglaswand wird durch Verwendung von Einmal-Plastik-Küvetten umgangen. Carbowax oder ähnliche adsorptionshemmende Substanzen brauchen dann nicht zugesetzt zu werden.
Das Mischen der Inkubate mit Human-Plasmin darf nur durch vorsichtiges Umkippen der Eppendorf-Gefäße erfolgen.

3) Spaltung von ITI durch Human-Plasmin

490 µl Human-Plasmin-Stammlösung (≙ 2,3 nMol),
50 µl K_2CO_3-Tris-Puffer-Gemisch (1+10) und
100 µl Tris-Puffer, pH 7,4 (aus Kap. D.III.2)
werden bei 25°C vorinkubiert. Nichtblutendes pH-Papier zeigt pH 7,4.
Start der Spaltung durch Zugabe von
20 µl ITI-Stammlösung (≙ 1,8 nMol).
Nach x Minuten erfolgt Säurefällung usw. analog Kap. D.I.5.
Nach der Neutralisation (auf pH 7,8) werden
300 µl Überstand (≙ 4,9 mIU Hemmaktivität gegenüber Trypsin) in den BAPA-Test (Kap. D.I.1) eingesetzt.

4) Plasmin-Hemmung durch plasminolytisch gewonnenen säurestabilen Inhibitor

Herstellung des Inhibitors:
350 µl Human-Plasmin-Stammlösung (≙ 1,65 nMol) und
30 µl K_2CO_3-Tris-Puffer-Gemisch (1+10)
werden bei 25°C vorinkubiert.
Nichtblutendes pH-Papier zeigt pH 7,4.
Start der Inhibitorspaltung durch Zugabe von
20 µl ITI-Stammlösung (≙ 1,8 nMol ITI).
Nach 17 Stunden erfolgt Säurefällung usw. analog D.I.5.

IV. Messungen mit Schweine-Pankreas-Kallikrein

1) Aktivitätsmessung

Enzym: Schweine-Pankreas-Kallikrein (33 µg/ml) in aqua dest. gelöst.
Puffer: 0,05 M Tris (Trishydroxymethyl-aminomethan) in aqua dest. pH 9,0 wird mit HCl eingestellt.
Substrat: S-2266 0,93 mg/ml in aqua dest. (≙ 1,6 mM).

Pipettierschema:
(850 - x) µl Tris-Puffer, pH 9,0, 50 µl Kallikrein und
x µl Inhibitor 15 Minuten bei 25°C inkubieren. Dann
100 µl Substrat dazugeben und den Extinktionsanstieg
pro Minute bei 405 nm messen.

2) Spaltung von Inter-α-Trypsin-Inhibitor durch Schweine-Pankreas-Kallikrein

20 µl Kallikrein-Stammlösung (5 mg/ml) (≙ 3,3 nMol) und
875 µl Tris-Puffer, pH 9,0 (bzw. pH 7,4) werden bei 25°C
vorinkubiert. Wenn die Verdünnung 25°C erreicht hat, werden
640 µl davon (≙ 2,3 nMol Kallikrein) zu
20 µl ITI-Stammlösung (≙ 1,8 nMol ITI) pipettiert.
Nach x Minuten erfolgt Säurefällung usw. analog D.I.5.
Nach der Neutralisation auf pH 7,8 werden
300 µl Überstand (≙ 4,9 mIU Hemmaktivität gegenüber Trypsin) in den BAPA-Test zur Hemmung von Trypsin eingesetzt.

3) Spaltung von ITI durch Schweine-Pankreas-Kallikrein im Molverhältnis 1 : 26

340 µl Tris-Puffer, pH 9,0 und
300 µl Kallikrein-Stammlösung (≙ 47 nMol)
werden bei 25°C vorinkubiert.
Start der Inhibitorspaltung erfolgt durch Zugabe von
20 µl ITI-Stammlösung (≙ 1,8 nMol ITI).
Nach x Minuten erfolgt Säurefällung in 45°C warmer $HClO_4$.
Weiteres Vorgehen analog Kap. D.I.5.
Nach Neutralisation werden 300 µl Überstand (≙ 4,9 mIU
Hemmaktivität gegenüber Trypsin) in den BAPA-Test (D.I.1)
zur Trypsin-Hemmung eingesetzt.

V. Untersuchungen über die proteolytische Verunreinigung im ITI-Präparat

1) Aktivitätsmessung

"Enzym": ITI-Stammlösung (22 mg/ml)
Substrate: S-2251 (Human-Plasmin) aus Kap. D.III.2
S-2266 (Drüsen-Kallikrein) aus Kap. D.IV.1
S-2302 (Plasma-Kallikrein) 2 mg/ml in aqua dest.
Puffer: 0,05 M Tris, pH 9,0 aus Kap. D.IV.1 (für S-2266)
0,05 M Tris, pH 7,4 aus Kap. D.III.2 (für S-2251 und S-2302).

Pipettierschema:
(500 - x) µl Puffer, 10 µl ITI-Stammlösung und x µl Inhibitor 15 Minuten lang bei 25°C inkubieren, dann 100 µl Substrat dazugeben.

2) Hemmung durch NPGB

"Enzym": ITI-Stammlösung (22 mg ITI pro ml)
"Hemmstoff": 1,5 mg NPGB werden in 1 ml Dimethylformamid gelöst und anschließend 1:5 mit Acetonitril verdünnt. Man erhält eine Lösung mit 0,3 mg NPGB pro ml. 50 µl enthalten 15 µg NPGB $\hat{=}$ $4{,}45 \cdot 10^{-8}$ Mol NPGB.
Puffer: 0,05 M Tris, pH 9 aus Kap. D.IV.1
Substrat: S-2266 0,93 mg/ml aus Kap. D.IV.1
Pipettierschema:

Küvette	"Enzymatische Spaltung"	"Eigenspaltung"	"Enzym-Haltbarkeit"
Tris-Puffer	530 µl	550 µl	580 µl
NPGB	50 µl	50 µl	-
	Extinktionszunahme messen (Eigenspaltung)		
		Danach Zugabe von	
ITI	20 µl	-	20 µl
	Extinktionszunahme/min messen. Nach 18 Std.		
S - 2266	50 µl	-	50 µl
	Extinktionszunahme/Minute bei 405 nm messen.		

E. ZUSAMMENFASSUNG

1) Um Enzyme zu finden, die physiologischerweise aus Inter-α-Trypsin-Inhibitor (ITI) säurestabile Inhibitoren abspalten, wurden Rinder-Trypsin, Schweine- und Human-Plasmin sowie Schweine-Pankreas-Kallikrein als typische Proteinasenvertreter in vitro mit ITI inkubiert.

2) Anschließend wurde das Hemmverhalten von ITI und den abgespaltenen niedermolekularen Inhibitoren gegenüber den spaltenden Enzymen verglichen, um daraus möglicherweise einen Hinweis auf die physiologische Funktion der niedermolekularen Inhibitoren und des ITI zu gewinnen.

3) Es wurde ein Säurefällungsverfahren ausgearbeitet, das ermöglicht, säurestabile Inhibitoren von ihrem säurelabilen Ausgangsstoff, dem Inter-α-Trypsin-Inhibitor, vollständig abzutrennen und die gesamte freigesetzte Inhibitormenge durch Hemmung von Trypsin nachzuweisen.

4) Durch die hier erprobte schonende Säurefällung konnte erstmals gezeigt werden, daß ITI durch Spaltung mit Trypsin quantitativ in säurestabile Inhibitoren umgesetzt wird.

5) Mit Rinder-Trypsin, Schweine- und Human-Plasmin und mit Schweine-Pankreas-Kallikrein wurden unter gleichen Bedingungen (2,7 µMol ITI/l und 1,3-fache molare Enzymmenge) folgende Geschwindigkeiten der ITI-Spaltung gemessen:

	gemessene Spaltgeschw. $\left[\text{Mol} \cdot l^{-1} \cdot \text{min}^{-1}\right]$	relative Spaltgeschw. $\left[v_{\text{H.-Plasmin}} = 1\right]$
Rinder-Trypsin	$5{,}0 \cdot 10^{-7}$	12
Schweine-Plasmin	$3{,}9 \cdot 10^{-8}$	0,97
Human-Plasmin	$4{,}0 \cdot 10^{-8}$	1,0
Schweine-Pankreas-Kallikrein	$2{,}4 \cdot 10^{-10}$	0,006

Aus dem Vergleich der Spaltgeschwindigkeiten ergibt sich, daß als physiologisch spaltende Enzyme trypsinähnliche Proteinasen und Plasmin in Frage kommen, jedoch kaum die Kallikreine.

6) Durch nativen ITI und seine säurestabilen Spaltprodukte wird Rinder-Trypsin stark gehemmt, Schweine-Plasmin schwächer, Human-Plasmin nur sehr schwach und Schweine-Pankreas-Kallikrein praktisch nicht. Human-Plasmin wird durch nativen ITI und durch die plasminolytisch freigesetzten säurestabilen Inhibitoren noch schwächer gehemmt als durch die tryptischen Spaltprodukte.
Insgesamt unterscheidet sich das Hemmverhalten der niedermolekularen Inhibitoren nicht wesentlich von dem des nativen ITI.

7) Die niedermolekularen säurestabilen Inhibitoren unterscheiden sich vom nativen ITI also nur durch solche Eigenschaften, die durch das niedrigere Molekulargewicht gegeben sind. Die besondere physiologische Funktion der niedermolekularen Spaltprodukte des ITI dürfte somit auf ihrer Säurestabilität, der erhöhten Diffusionsgeschwindigkeit und der glomerulären Filtrierbarkeit basieren.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1) Astrup, T., Alkajaer, K. & Soardi, F. (1959):
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 11, S. 181-184.

2) Astrup, T. & Nissen, U. (1964):
Nature (London) 203, S. 255-257.

3) Astrup, T. & Sterndorf, J. (1955):
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 7, S. 239-245.

4) Bieth, J., Aubry, M. & Travis, J. (1974):
in (16), S. 53-62.

5) Bretzel, G. & Hochstrasser, K. (1976):
Z. Physiol. Chem. 357, S. 487-489.

6) Chase, T., jr. & Shaw, E. (1970):
in "Methods in Enzymology", Vol. XIX, S. 20-27.

7) Feeney, R. E., Means, G. E., Bigler, J. C. (1969):
J. Biol. Chem. 244, S. 1957-1960.

8) Feuth, H., Kemkes, B. & Hochstrasser, K. (1975):
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum, S. 133-136.

9) Feuth, H., Kemkes, B. & Hochstrasser, K. (1975):
in (36), S. 445-449.

10) Figarella, C., Negri, G. A. & Guy, O. (1974):
in (16), S. 213-222.

11) Finkenstadt, W. R. & Laskowski, M., jr. (1965):
J. Biol. Chem. 240, S. 962-963.

12) Fritz, H. & Tschesche, H. (Herausg.) (1971):
Proteinase Inhibitors, Proceedings of the First International Research Conference, Munich 1970,
Walter de Gruyter, Berlin.

13) Fritz, H., Brey, B., Müller, M. & Gebhardt, M. (1971):
in (12), S. 28-37.

14) Fritz, H., Heimburger, N., Meier, M., Arnhold, M., Zaneveld, L. & Schumacher, G. (1972): Z. Physiol. Chem. 353, S. 1953-1956.

15) Fritz, H., Trautschold, I. & Werle, E. (1974): in "Methoden der enzymatischen Analyse" (Bergmeyer, H. U., Herausg.), 3. Aufl., Bd. I, S. 1105-1122. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.

16) Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L. J. & Truscheit, E. (Herausg.) (1974): Proteinase Inhibitors, Proceedings of the Second International Research Conference - Bayer Symposium V. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

17) Ganong, W. F. (1974): Lehrbuch der Medizinischen Physiologie, 3. Aufl., S. 473-475. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

18) Green, N. M. & Work, E (1953): Biochem. J. 54, S. 347-352.

19) Heimburger, N. & Schwiek, H. G. (1962): Thromb. Diath. Haemorrh. 7, S. 432.

20) Heimburger, N., Haupt, H. & Schwiek, H. G. (1971): in (12), S. 1-21.

21) Heimburger, N. (1974): in (16), S. 14-22.

22) Hochstrasser, K., Reichert, R., Matzner, M. & Werle, E.: Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10, S. 104-107 (1972).

23) Hochstrasser, K., Reichert, R., Schwarz, S. & Werle, E.: Z. Physiol. Chem. 353, S. 221-226 (1972).

24) Hochstrasser, K., Reichert, R., Schwarz, S. & Werle, E.: Z. Physiol. Chem. 354, S. 923-926 (1973).

25) Hochstrasser, K., Feuth, H. & Steiner, O. (1973): Z. Physiol. Chem. 354, S. 927-932.

26) Hochstrasser, K., Feuth, H., Fall, O. & Kemkes, B. (1974):
Klin. Wochenschr. 52, S. 1015-1017.

27) Hochstrasser, K., Feuth, H., Kemkes, B. & Fall, O.(1974):
Klin. Wochenschr. 52, S. 1018-1020.

28) Hochstrasser, K., Feuth, H. & Hochgesand, K. (1974):
in (16), S. 111-116.

29) Hochstrasser, K., Bretzel, G., Feuth, H., Hilla, W. &
Lempart, K. (1976):
Z. Physiol. Chem. 357, S. 153-162.

30) Huber, R., Kukla, D., Rühlmann, A. & Steigemann, W. (1971):
in (12), S. 56-64.

31) Kunitz, M. & Northrop, J. H. (1936):
J. Gen. Physiol. 19, S. 991-1007.

32) Laskowski, M., jr. & Sealock, R. W. (1971):
in "The Enzymes" (Boyer, P. D., Herausg.),
3. Aufl., Bd. 3, S. 375-473.
Academic Press, New York.

33) Mallory, P. A., Travis, J. (1973):
Biochemistry 12, S. 2847-2851.

34) Nitschmann, J., Kistler, P. & Lergier, W. (1954):
Helv. Chim. Acta 37, S. 886.

35) Ozawa, K. & Laskowski, M., jr. (1966):
J. Biol. Chem. 241, S. 3955-3961.

36) Peeters, H. (Herausg.) (1975):
Proceedings of the 23rd Colloquium
"Protides of Biological Fluids".
Pergamon-Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris.

37) Proksch, G. J. & Routh, J. I. (1972):
J. Lab. Clin. Med. 79, S. 491-499.

38) Reichert, R., Hochstrasser, K. & Werle, E. (1972):
Z. Laryng. Rhinol. 51, S. 190-193.

39) Reichert, R., Hochstrasser, K. & Conradi, G. (1972):
Pneumologie 147, S. 13-20.

40) Reichert, R., Hochstrasser, K. & Naumann, H. H. (1973):
Acta Otolaryng. 75, S. 239-242.

41) Shulman, N. R. (1955):
J. Biol. Chem. 213, S. 656-671.

42) Steinbuch, M., Audran, R., Lambin, P. & Fine, J. M. (1975):
in (36), S. 115-118.

43) Steinbuch, M. (1976):
in "Methods in Enzymology, XLV" (Lorand, L., Herausg.),
S. 760-772, Academic Press, New York.

44) Trautschold, I., Fritz, H. & Werle, E. (1970):
in "Methoden der enzymatischen Analyse"
(Bergmeyer, H. U., Herausg.), 2. Aufl., Bd. I, S. 1011-1020.

45) Travis, J. (1971):
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, S. 793-796.

46) Vogel, R., Trautschold, I. & Werle, E. (1968):
Natural Proteinase Inhibitors
Academic Press, New York.

47) Wallner, O., Fritz, H. & Hochstrasser, K. (1975):
in (36), S. 177-182.

L E B E N S L A U F

1. Angaben zur Person:

Name:	DOBRINSKI, Wolfgang
Geburtsdatum:	3.März 1951
Geburtsort:	Garmisch-Partenkirchen

2. Schulbildung:

1957-1961	Volksschule in Garmisch-Partenkirchen
1961-1970	Mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig des Werdenfels-Gymnasiums in Garmisch-Partenkirchen

3. Studium:

1971-1974	Physik-Studium an der Technischen Universität München
1973	Diplom-Vorprüfung in Physik
1974-1979	Medizin-Studium an der Ludwig Maximilians-Universität zu München
1979	Approbation als Arzt

4. Berufstätigkeit:

Seit 1979	Assistenzarzt an der Medizinischen Poliklinik der Universität München

München, 3.September 1980

Wolfgang Dobrinski